

C_1 -Kettenverlängerung von Aminosäuren:
Untersuchungen über α -Benzylmalat-Synthase
und α -Benzylmalat-Isomerase

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

Vorgelegt dem Fachbereich Chemie
der Philipps-Universität Marburg/Lahn

von

DIETRICH THOMAS DÖRNEMANN
aus Zwickau

Marburg/Lahn 1977

Druck: Mauersberger, Marburg

C_1 -Kettenverlängerung von Aminosäuren:
Untersuchungen über α -Benzylmalat-Synthase
und α -Benzylmalat-Isomerase

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

Vorgelegt dem Fachbereich Chemie
der Philipps-Universität Marburg/Lahn

von

DIETRICH THOMAS DÖRNEMANN
aus Zwickau

Marburg/Lahn 1977

Druck: Mauersberger, Marburg



Von dem Fachbereich Chemie der
Philipps-Universität Marburg/Lahn

als Dissertation angenommen am : 21. 1. 1977

Tag der mündlichen Prüfung : 9. 2. 1977

Berichterstatter : Professor Dr. H. Kindl

Mitberichterstatter : Professor Dr. H. Follmann

=====

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

Zusammenfassung	1
A <u>Einleitung und Problemstellung</u>	2
B <u>Methodik</u>	7
1. Aufzucht des Pflanzenmaterials	7
2. Aufarbeitungen	7
2.1 Verwendete Puffersysteme	7
2.2 Homogenisationsverfahren	7
2.3 Inkubation von zellfreien Homogenaten aus <u>B. vulgaris</u> und <u>N. officinale</u> mit Acetyl-Coenzym-A-2- ^{14}C und Phenylpyruvat	8
2.4 Inkubation von zellfreien Extrakten aus <u>N. officinale</u> mit α -Benzyläpfelsäure-2- ^{14}C	9
2.5 Inkubation von zellfreien Extrakten aus <u>N. officinale</u> mit markiertem Phenylalanin und Acetyl-Coenzym A	10
2.5.1 Inkubation verschiedener Zellfraktionen mit L-Phenylalanin-4- ^3H	10
2.5.2 Inkubation mit L-Phenylalanin-U- ^{14}C nach gelchromatographischer Anreicherung der Enzymaktivitäten	12
3. Synthesen	13
3.1 Synthese von β -Benzyläpfelsäure-1,2- ^{14}C	13
3.2 Darstellung von Acetylphosphat-2- ^{14}C	16
3.3 Enzymatische Synthese von Acetyl-Coenzym A-2- ^{14}C	16
4. Chromatographische Methoden	17
4.1 Papierchromatographie	17
4.2 Dünnschichtchromatographie	19
4.3 Analytische und präparative Gaschromatographie	21
4.4 Proteintrennungen	24
4.5 Reinheitsprüfung und Bestimmung der markierten Verbindungen	26
4.6 Weitere quantitative Bestimmungen	27
C <u>Ergebnisse</u>	28
1. Übersichtsschema der untersuchten Reaktionssequenz	28
1.1 Nachweis einer α -Benzylmalat-isomeraseaktivität in zellfreien Extrakten aus <u>N. officinale</u>	30

1.2	Kondensation von Acetyl-Coenzym-A-2- ^{14}C mit Phenylpyruvat in zellfreien Homogenaten von <u>B. vulgaris</u> und <u>N. officinale</u>	33
1.3	Nachweis der Überführung von Phenylpyruvat-4- ^3H in Benzylmalat durch verschiedene <u>in vitro</u> -Systeme	36
1.3.1	Nachweis von α -Benzylmalat-Synthase- und Isomeraseaktivitäten in Rohextrakten und Membranfraktionen aus <u>N.officinale</u>	36
1.3.2	Intrazelluläre Lokalisierung der α -Benzylmalat-Synthase	40
1.3.3	Nachweis einer α -Benzylmalat-Synthaseaktivität in Eluaten von einer Sephadex G-50-Säule	50
1.4	Nachweis des Einbaus von L-Phenylalanin-U- ^{14}C in Benzylmalat <u>in vitro</u>	51
1.4.1	Bestimmung des Molekulargewichts von α -Benzylmalat-Synthase über Sephadex G-50	52
1.4.2	Nachweis von α -Benzylmalat-Synthase in Ammoniumsulfat-fällungen von Zentrifugations-überständen	55
1.4.3	Bestimmung des Molekulargewichts von α -Benzylmalat-Synthase über eine kalibrierte Sephadex G-100-Säule	57
2.	Radiochemische Synthesen	68
2.1	Synthese von β -Benzyläpfelsäure-1,2- ^{14}C	68
2.2	Enzymatische Synthese von Acetyl-Coenzym A-2- ^{14}C	72
3.	Auswertung der kombinierten GC-Massenspektren	73
D	<u>Diskussion</u>	76
E	<u>Literaturverzeichnis</u>	81

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen:

(soweit nicht im Text erklärt)

1	<u>B. vulgaris:</u>	Barbarea vulgaris
2	DC:	Dünnschichtchromatographie
3	DTT:	Dithiothreitol
4	Fr.:	Fraktion
5	GC:	Gaschromatographie
6	Hepes:	2-[4-(2-Hydroxyäthyl)-piperazinyl-(1)]- äthansulfonsäure
7	LAOD:	L-Aminosäureoxidase
8	max.:	maximal
9	MG:	Molekulargewicht
10	min, h:	Minute(n), Stunde(n)
11	MSTFA:	N-Methyl-N-trimethylsilyl-trifluoracet- amid
12	<u>N. officinale:</u>	Nasturtium officinale
13	PC:	Papierchromatographie
14	PTA:	Phosphotransacetylase
15	RRT:	Relative Retentionszeit
16	TCA:	Trichloressigsäure
17	Tris-HCl:	Tris(Hydroxymethyl)aminomethan . HCl
18	U:	Unit, Enzymeinheit
19	w/v, w/w:	Mischungsverhältnisse Gewicht/Volumen, Gewicht/Gewicht

1.2	Kondensation von Acetyl-Coenzym-A-2- ^{14}C mit Phenylpyruvat in zellfreien Homogenaten von <u>B. vulgaris</u> und <u>N. officinale</u>	33
1.3	Nachweis der Überführung von Phenylpyruvat-4- ^3H in Benzylmalat durch verschiedene <u>in vitro</u> -Systeme	36
1.3.1	Nachweis von α -Benzylmalat-Synthase- und Isomeraseaktivitäten in Rohextrakten und Membranfraktionen aus <u>N.officinale</u>	36
1.3.2	Intrazelluläre Lokalisierung der α -Benzylmalat-Synthase	40
1.3.3	Nachweis einer α -Benzylmalat-Synthaseaktivität in Eluaten von einer Sephadex G-50-Säule	50
1.4	Nachweis des Einbaus von L-Phenylalanin-U- ^{14}C in Benzylmalat <u>in vitro</u>	51
1.4.1	Bestimmung des Molekulargewichts von α -Benzylmalat-Synthase über Sephadex G-50	52
1.4.2	Nachweis von α -Benzylmalat-Synthase in Ammoniumsulfatfällungen von Zentrifugationsüberständen	55
1.4.3	Bestimmung des Molekulargewichts von α -Benzylmalat-Synthase über eine kalibrierte Sephadex G-100-Säule	57
2.	Radiochemische Synthesen	68
2.1	Synthese von β -Benzyläpfelsäure-1,2- ^{14}C	68
2.2	Enzymatische Synthese von Acetyl-Coenzym A-2- ^{14}C	72
3.	Auswertung der kombinierten GC-Massenspektren	73
D	<u>Diskussion</u>	76
E	<u>Literaturverzeichnis</u>	81

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen:

(soweit nicht im Text erklärt)

1	<u>B. vulgaris:</u>	Barbarea vulgaris
2	DC:	Dünnschichtchromatographie
3	DTT:	Dithiothreitol
4	Fr.:	Fraktion
5	GC:	Gaschromatographie
6	Hepes:	2-[4-(2-Hydroxyäthyl)-piperazinyl-(1)]-äthansulfonsäure
7	LAOD:	L-Aminosäureoxidase
8	max.:	maximal
9	MG:	Molekulargewicht
10	min, h:	Minute(n), Stunde(n)
11	MSTFA:	N-Methyl-N-trimethylsilyl-trifluoracetamid
12	<u>N. officinale:</u>	Nasturtium officinale
13	PC:	Papierchromatographie
14	PTA:	Phosphotransacetylase
15	RRT:	Relative Retentionszeit
16	TCA:	Trichloressigsäure
17	Tris-HCl:	Tris(Hydroxymethyl)aminomethan · HCl
18	U:	Unit, Enzymeinheit
19	w/v, w/w:	Mischungsverhältnisse Gewicht/Volumen, Gewicht/Gewicht



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552327_0085

Zusammenfassung

Es wurde die Bildung von α -Benzyläpfelsäure aus Phenylalanin und Acetyl-Coenzym A über Phenylpyruvat als Zwischenstufe, die Isomerisierung zu β -Benzyläpfelsäure und die Oxidation und Decarboxylierung zu 2-Keto-4-phenylbuttersäure in vitro untersucht. Dieses Beispiel kann als Grundschemata für die Kettenverlängerung von aromatischen und aliphatischen Aminosäuren um ein C-Atom durch Ankondensation einer C_2 -Einheit und Abspaltung von CO_2 dienen.

1. Es konnte gezeigt werden, daß in zellfreien Präparationen aus Nasturtium officinale α -Benzyläpfelsäure aus Phenylalanin und Acetyl-Coenzym A über Phenylpyruvat gebildet wird. Die Reaktion wird durch ein Protein (α -Benzylmalatsynthase, "condensing enzyme") katalysiert, dessen Molekulargewicht zu 45.000 ± 5.000 Dalton bestimmt wurde. Das Protein ist löslich und daher vermutlich im Cytoplasma lokalisiert, könnte aber auch schwach an der Microsomenmembran assoziiert sein.
2. Die Existenz einer α -Benzylmalatisomerase konnte in zellfreien Extrakten aus Nasturtium officinale und Barbarea vulgaris nachgewiesen werden.
3. Ausgehend von β -Benzylmalat- $1,2-^{14}C$ konnte die Bildung von 2-Keto-4-phenylbuttersäure in zellfreien Homogenaten von N. officinale nicht nachgewiesen werden. Auch bei Inkubation von Rohextrakten mit Phenylalanin und Acetyl-Coenzym A konnte die Bildung der α -Ketosäure in vitro nicht belegt werden.

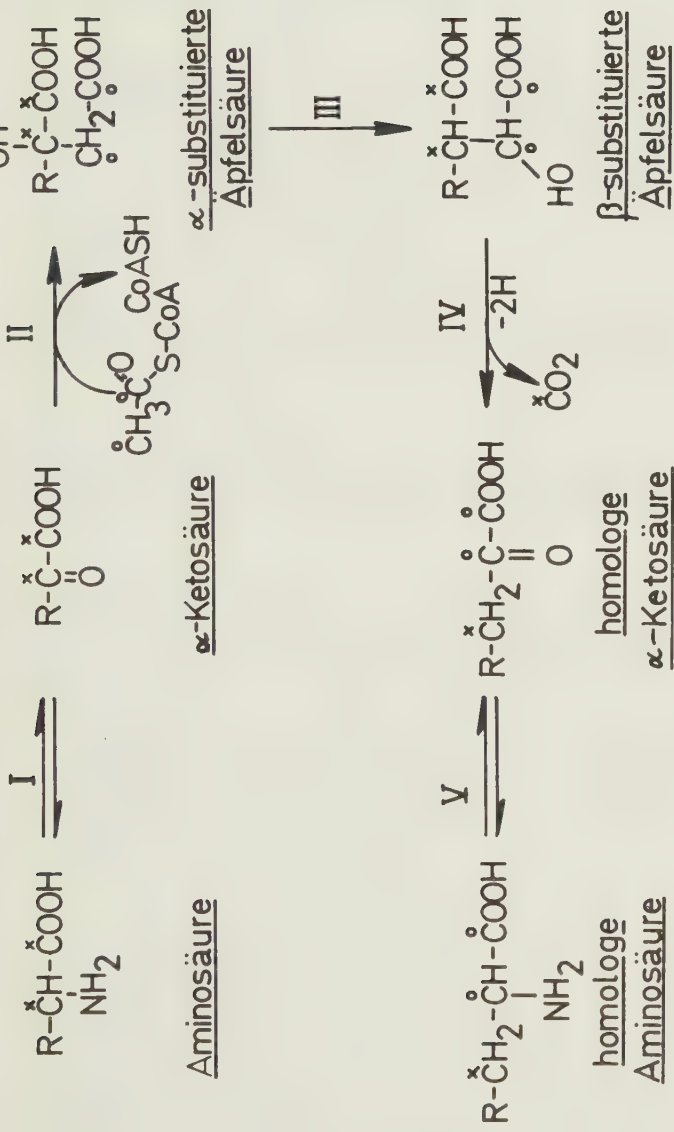
A Einleitung und Problemstellung

Die Kettenverlängerung von Aminosäuren um C_1 -Einheiten
- ein allgemeiner Mechanismus?!

Bei Bakterien und Pilzen konnten bisher zahlreiche Beweise dafür erbracht werden, daß bei der Biosynthese homologer Aminosäuren ein Mechanismus abläuft, bei dem die Vorläuferaminosäure unter Verwendung von Acetyl-Coenzym A um eine C_1 -Einheit verlängert wird. Dabei wird die Ausgangsaminosäure in einer Transaminierungsreaktion in die entsprechende α -Ketosäure überführt, aus der dann durch Kondensation mit Acetyl-Coenzym A ein α -substituiertes Malat gebildet wird. In einer Isomerasereaktion wird das β -Isomere gebildet, das anschließend durch Oxidation der Hydroxygruppe unter gleichzeitiger Decarboxylierung an C_α zur nächsthöheren α -Ketosäure führt. In einer weiteren Transaminierungsreaktion wird dann die homologe Aminosäure gebildet. Dieser allgemeine Mechanismus wird im ersten Schema (S.3) dargestellt.

Setzt man z.B. in dem allgemeinen Schema für den Rest R eine Isopropylgruppe($(CH_3)_2-CH-$) ein, so kommt man zum Valin und im folgenden Schritt zum α -Ketoisovalerat. Bereits 1965 konnten Webster, Gross und Nelson^{1,2)} in Neurospora ein Enzym nachweisen und charakterisieren, das mit Acetyl-Coenzym A und α -Ketoisovalerat als Substrat, α -Isopropylmalat, eine Vorstufe des Leucins, bildet. α -Isopropylmalat-Synthase (E.C. 4.1.3.12) ist das erste Enzym bei der Synthese von Leucin aus α -Ketoisovalerat in Pilzen und somit ein wichtiger Schritt bei der Biosynthese dieser Aminosäure, da bekannt ist, daß häufig dieser Schritt in der Biosynthesesequenz durch "feedback"-Hemmung reguliert ist.^{1,8)}

Daß die Biosynthese des Leucins auch in Salmonella typhimurium nach dem auf S. 3 skizzierten Schema verläuft, konnte biochemisch und genetisch ebenfalls belegt



Schema 1

Allgemeiner Mechanismus der Kettenverlängerung von Aminosäuren um C₁-Einheiten.
 I, V = Transaminasereaktionen; II = "condensing enzyme"; III = Isomerasereaktion;
 IV = Oxidation-Decarboxylierung

werden. ^{3,4,5,6)} 1969 wurde α -Isopropylmalat-Synthase aus S. typhimurium von Kohlhaw, Leary und Umbarger ⁷⁾ zur Homogenität gereinigt.

1975 berichteten Tracy und Kohlhaw ⁸⁾ über die reversible Coenzym A-abhängige Inhibierung von α -Isopropylmalat-Synthase und Homocitrat-Synthase (E.C. 4.1.3.21) aus Hefe. Das Vorkommen beider Enzyme in Hefe war bereits früher belegt worden. ^{9,10)}

Mit dem Nachweis der Homocitratsynthase in Hefe war ein weiteres Beispiel gefunden, bei dem ein "condensing enzyme"-System an der Bildung einer Aminosäure durch Kettenverlängerung um eine C_1 -Einheit, in diesem Falle der Biosynthese des Lysins, beteiligt ist ($R = -CH_2-CH_2-COOH$):

Glutamat $\rightarrow$ α -Ketoglutarat $\rightarrow$ Homocitrat $\rightarrow$ $\rightarrow$ Lysin

Dieser Weg wird in Pilzen und Euglenaphyta beschriftet, Bakterien, Grünalgen und höhere Pflanzen bilden Lysin aus Aspartat.

Ein Beispiel für die Homologisierung von Aminosäuren in höheren Pflanzen ist die Bildung von Leucin aus Valin ¹¹⁾ nach Schema 1.

Weitere Hinweise auf das Vorhandensein von "condensing enzyme"-Systemen in höheren Pflanzen konnten Chisholm und Wetter ¹²⁾ erbringen, als sie L-Methionin als Vorläufer bei der Bildung des Homomethionins in vivo erkannten. Unterstützt wurde dieser Befund durch die Entdeckung des Homomethionins als natürlich vorkommende Aminosäure. ¹³⁾

In vivo besser untersucht ist die Kettenverlängerung von Phenylalanin zur nächsthöheren homologen Aminosäure γ -Phenylbutyrin (2-Amino-4-phenylbuttersäure). So konnte Underhill zeigen, daß Phenylalanin und Acetat ¹⁴⁾, sowie mit höherer Einbaurate β -Benzylmalat ¹⁵⁾, in 2-Amino-4-phenylbuttersäure eingebaut wird. 1974 wurde die Rolle des α -Benzylmalats als Vorläufer des γ -Phenylbutyrins in vivo bestätigt ¹⁶⁾, so daß die Biosynthese dieser natürlichen Aminosäure aus Phenylalanin

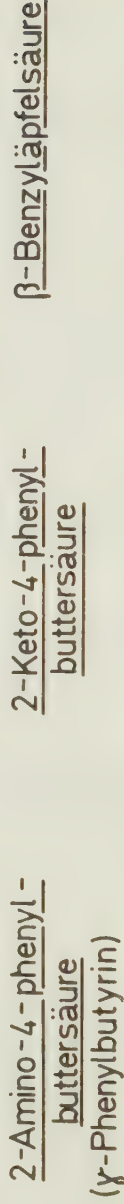
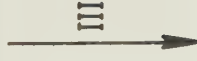
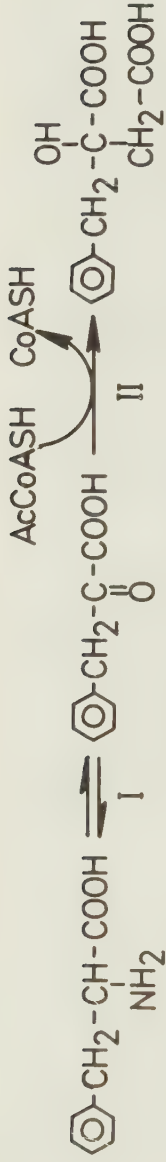
über α - und β -Benzylmalat in vivo als gesichert angesehen werden kann.

Weitere Beispiele ließen sich aufzeigen, die belegen, daß die in Schema 1 dargestellte Biosynthesesequenz eine weitreichende Bedeutung für die Biosynthese homologer Aminosäuren hat. Jedoch gibt es bisher wenig Beispiele für den Nachweis und die Charakterisierung von "condensing enzyme"-Systemen in höheren Pflanzen in vitro.

In der vorliegenden Arbeit wird der Versuch unternommen, α -Benzylmalatsynthase und α -Benzylmalatisomerase in vitro nachzuweisen und die Synthase partiell zu charakterisieren.

Zur Verdeutlichung der von den beiden Enzymen katalysierten Reaktionsschritte wird im folgenden Schema (S. 6) die Biosynthesesequenz vom Phenylalanin zum γ -Phenylbutyryn dargestellt.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß hinsichtlich der Unterschiedlichkeit der Organismen und der Verschiedenheit der Ausgangsaminosäuren die Kettenverlängerung um eine C_1 -Einheit, wie sie in Schema 1 dargestellt ist, ein weitverbreiteter Mechanismus bei der Biosynthese homologer Aminosäuren sein dürfte. Dies sollte auch für höhere Pflanzen zutreffen. Ein Beispiel dafür wird in dieser Arbeit gegeben.



Schema 2

Mechanismus der Kettenverlängerung von Phenylalanin um C₁
 I, V = Transaminasereaktionen; II = "condensing enzyme"; III = Isomerasereaktion
 IV = Oxidation-Decarboxylierung

B Methodik

1. Aufzucht des Pflanzenmaterials

Stecklinge der Wasserkresse (Nasturtium officinale) und - für wenige Experimente - von Barbarakraut (Barbarea vulgaris) wurden in einem Gewächshaus bei 18 - 20 °C unter natürlichen Tageslichtbedingungen angezogen. Die weitere Aufzucht des Pflanzenmaterials erfolgte in einem Pflanzenzuchttraum bei 17 - 19 °C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50 - 60 %. Die Beleuchtungsichte (Tageslichtneonröhren) betrug im Mittel 6000 Lux bei einem Tag-Nacht-Rhythmus von 12 h.

Zur Düngung der Pflanzen wurde Knoop'sche Lösung ¹⁷⁾ - vor allem zur Förderung der Wurzelbildung bei Stecklingen aus älteren Pflanzen - hauptsächlich aber Voll-dünger "Blaukorn" (BASF, 12 % Stickstoff, 12 % Phosphat, 17 % Kali, 2 % Magnesia, chloridfrei) verwendet.

2. Aufarbeitungen

2.1 Verwendete Puffersysteme

Puffer A: 0,1 M Hepes, pH 8,0; 10 mM MgCl₂; 1 mM DTT

Puffer B: 0,15 M Hepes, pH 7,8; 10 mM MgCl₂; 5 mM DTT

Puffer C: 0,2 M Tris-HCl, pH 8,0; 1 mM DTT

2.2 Homogenisationsverfahren

a) Blätter von N. officinale und B. vulgaris wurden je nach Menge in 2 - 5 ml Puffer als Schutzmedium mit einer Schere möglichst gut zerschnitten und unter Zusatz von weiterem Puffer (insgesamt maximal 10 ml auf 10 g Blätter) mit einem Ultraturax bei 30 - 40 Volt ca. 2 min vorzerkleinert und anschließend bei 180 - 220 Volt ca. 1 min völlig homogenisiert. Das Homogenat wurde über eine Doppellage "Miracloth" (Calbiochem) abgepreßt und die Präparation, wie später genauer beschrieben, zentrifugiert.

b) Um eine höhere Ausbeute an intakten Organellen zu erreichen, wurden Blätter von N. officinale in kleinen Portionen auf einem tiefgekühlten Kunststoffblock mit Wanne im Eisbad unter Zugabe von möglichst wenig Puffer mit dem Skalpell homogenisiert. Das Homogenat wurde über "Miracloth" abgepreßt und zentrifugiert.

Die Operationen bis zur Inkubation wurden in allen Aufarbeitungen bei 0 - 4 °C durchgeführt.

2.3 Inkubation von zellfreien Homogenaten aus B. vulgaris und N. officinale mit Acetyl- Coenzym A-2-¹⁴C und Phenylpyruvat

Acetyl-Coenzym A-2-¹⁴C wurde aus Acetylphosphat-2-¹⁴C durch Vorinkubation folgender Reagentien synthetisiert: Je 4,7 mg Acetylphosphat-2-¹⁴C (spez. Akt. 4,4 µCi/mg, 4×10^{-3} M), 8 mg CoASH ($1,3 \times 10^{-3}$ M), 3 mg GSH ($1,2 \times 10^{-3}$ M) und 100 µg Phosphotransacetylase (spez. Akt. 1000 U/mg, Clostridium kluyveri) wurden in 500 µl Puffer A gelöst und 2 min bei Zimmertemperatur geschüttelt. Die Vorinkubationslösung wurde anschließend sofort mit den Rohextrakten aus N. officinale und B. vulgaris vereinigt und 30 min bei Zimmertemperatur inkubiert.

Für die Herstellung der Präparationen wurden jeweils 10 g Blätter beider Pflanzen in je 5 ml Puffer A, der 10^{-2} M an Phenylpyruvat war, homogenisiert (B 2.2) und durch "Miracloth" abgepreßt.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden jeweils 3 mg 2-Keto-4-phenylbuttersäure und 3 mg α- und β-Benzyläpfelsäure als Träger zugegeben und die Reaktion mit 1 ml konz. HCl gestoppt. Nach 5-fachem Ausäthern wurden die Extrakte in System B (B 4.1) papierchromatographisch aufgetrennt und die Radioaktivitätszonen, die nach den Rf-Werten 2-Keto-4-phenylbuttersäure und den Benzyläpfelsäuren entsprachen, nochmals im gleichen System rechromatographiert.

Die Methanoleluate der Benzyläpfelsäurezonen wurden gaschromatographisch weiter charakterisiert. Die Eluate der 2-Keto-4-phenylbuttersäurezonen wurden wegen der geringen Radioaktivitätsmengen nochmals im gleichen Laufmittel rechromatographiert. Jeweils ein Teststreifen wurde in 14 gleiche Fraktionen aufgeteilt und im Flüssigkeitsszintillationszähler ausgewertet (B 4.5).

2.4 Inkubation von zellfreien Extrakten aus N. officinale mit α -Benzyläpfelsäure-2- ^{14}C

Blätter von N. officinale wurden in Puffer C homogenisiert (B 2.2 a)) und die Präparation 15 min bei max. 39.000xg zentrifugiert. Der Überstand wurde in einer 50 ml Amiconzelle mit einer PM10-Membran (Amicon, Ausschlußmolekulargewicht 10.000) unter Rühren bei ca. 4,5 kg/cm² Druck (N₂) ankonzentriert und mit α -Benzyläpfelsäure-2- ^{14}C (spez. Akt. 268 $\mu\text{Ci/mMol}$, Konzentration in der Inkubationslösung $4,5 \times 10^{-4}\text{M}$), 1 h bei Zimmertemperatur inkubiert. Der Niederschlag, der sich bei der Zentrifugation des Homogenats ergab, wurde mit einem weichen Pinsel in 5 ml Puffer C resuspendiert und der gleichen Inkubation wie der Überstand unterworfen (Konzentration α -Benzyläpfelsäure $1,8 \times 10^{-3}\text{M}$).

Zum Stoppen der Reaktion wurden beide Gemische mit je 2 mg α - und β -Benzyläpfelsäure versetzt und mit konz. HCl angesäuert. Nach mehrmaligem Ausschütteln mit Äther wurden die Extrakte in System A (B 4.1) papierchromatographisch aufgetrennt. Die Radioaktivität unter dem Benzyläpfelsäurepeak (B 4.5) wurde mit Methanol eluiert, die Eluate mit Diazomethan methyliert und, wie in B 4.3 beschrieben, weiter gaschromatographisch aufgearbeitet.

2.5 Inkubation von zellfreien Extrakten aus
N. officinale mit markiertem Phenylalanin
und Acetyl-Coenzym A

2.5.1 Inkubation verschiedener Zellfraktionen
mit L-Phenylalanin-4-³H

Ein Rohextrakt und ein 150.000xg-Niederschlag wurden aus Blättern von N. officinale wie folgt präpariert: Nach dem Homogenisieren (B 2.2 a)) in Puffer B wurde eine Hälfte des Rohextraktes ohne Vorzentrifugation, wie weiter unten beschrieben, direkt inkubiert. Der andere Teil der Präparation wurde ebenfalls ohne Vortrennung einer Ultrazentrifugation (Beckman, Spinco L5 65) bei max. 150.000xg unterworfen und der Niederschlag im gleichen Puffer-Volumen (Puffer B) wie der Rohextrakt suspendiert. Die Inkubationsbedingungen für beide Präparationen werden im folgenden beschrieben.

Zur Überführung des Phenylalanins in Phenylpyruvat wurden in einer Vorinkubation im gleichen Puffersystem folgende Coenzyme, Substrate und Hilfsenzyme verwendet: Je 250 μ Ci L-Phenylalanin-4-³H (spez. Akt. 12 Ci/ μ Mol, Amersham), 500 μ l L-Phenylalanin, inaktiv (Konzentration in der Inkubation 10^{-4} M) und 100 μ g L-Aminosäureoxidase (spez. Akt. 7 U/mg, Schlangengift) wurden 2 min bei Zimmertemperatur gehalten und anschließend mit Niederschlag und Rohextrakt vereinigt, die vorher mit ATP (5×10^{-4} M), Ac CoA (3×10^{-4} M), CoA (5×10^{-4} M), Acetylphosphat (6×10^{-3} M) und 100 μ g Phosphotransacetylase (1.000 U/mg, Clostridium kluyveri) versetzt worden waren. Die Inkubationsgemische wurden 30 min bei Zimmertemperatur geschüttelt und die Reaktion unter Zugabe von 2 mg α - und β -Benzyläpfelsäure als Träger mit 1 ml konz. Hcl abgebrochen. Nach 5-maligem Ausschütteln mit Äther wurden die Ätherextrakte papierchromatographisch (B 4.3) weiter identifiziert.

Als Variation dieses Aufarbeitungsverfahrens wurden die Blätter mit einem Skalpell in Puffer B zerkleinert (B 2.2 b)) und zentrifugiert. Der 5.000xg-Niederschlag, die Hälfte des aus dem 5.000xg-Überstands gewonnenen

15.000xg-Niederschlags und des 15.000xg-Überstands, sowie eine Suspension aus beiden Komponenten wurden, wie oben beschrieben, inkubiert und weiter aufgearbeitet.

Zur besseren Auftrennung der Zellfragmente wurde das Blattmaterial zunächst wie in B 2.2 a) beschrieben homogenisiert und nach einer Vorzentrifugation (2 min) bei 800xg einer Differentialzentrifugation unterworfen. Dazu wurde der 800xg-Überstand 5 min bei 3.000xg, der 3.000xg-Überstand 25 min bei 15.000xg und der 15.000xg-Überstand 1 h bei 150.000xg zentrifugiert.

Die Niederschläge wurden jeweils in Puffer B suspendiert und eine Hälfte wie oben beschrieben 30 min inkubiert und weiter aufgearbeitet. Die andere Hälfte der 15.000- und 150.000xg-Niederschlagssuspensionen wurde jeweils auf einen linearen Saccharosegradienten (25-55 % Saccharose) aufgetragen und 3 1/2 h bei max. 131.000xg zentrifugiert. Die Gradienten wurden fraktioniert (1,5 ml Fraktionen) und auf Leitenzyme verschiedener Zellorganellen (Fumarase, Katalase) getestet. Weiterhin wurde in allen Niederschlägen und Gradientenfraktionen eine Proteinbestimmung (B 4.6)¹⁸⁾ durchgeführt; in allen Niederschlägen und in den grünen Banden der Gradienten wurde der Chlorophyllgehalt¹⁹⁾ bestimmt.

Eine weitere Variante bei der Auftrennung der Zellfraktionen bestand darin, die Rohextrakte über einen Saccharose-Stufengradienten zu fraktionieren. Das Homogenisieren wurde dabei wie in B 2.2 a) beschrieben durchgeführt, jedoch wurde dem "grinding medium" (Puffer B) 15 % Saccharose zugesetzt. Die erhaltene Präparation wurde auf einen Stufengradienten (25,36,50 % Saccharose) aufgetragen und 45 min bei max. 131.000xg (SW 27, Beckman) zentrifugiert. Die Niederschläge auf den jeweiligen Saccharosepolstern und der Überstand wurden mit einer Spritze abgesaugt und wie oben beschrieben 30 min inkubiert und weiter aufgearbeitet. Ein weiteres Verfahren für die Auftrennung von Rohextrakten war die Fraktionierung der Präparationen über eine Sephadex G-50-Säule (B 4.4 a)) ohne vorherige Zentrifugation. Die Inkubation und die weitere Aufarbeitung erfolgte wie oben beschrieben, jedoch

wurde Puffer C verwendet. Die Inkubationsansätze enthielten kein Coenzym A und ATP. Anstelle der gaschromatographischen Identifizierung des Benzylmalats nach der papierchromatographischen Reinigung wurde bis zur konstanten spezifischen Aktivität umkristallisiert (B 4.5).

2.5.2 Inkubation mit L-Phenylalanin-U-¹⁴C nach gel-chromatographischer Anreicherung der Enzymaktivitäten

Trotz des Versuchs, das Verschmieren der Radioaktivität der Reaktionsprodukte aus L-Phenylalanin-4-³H GC-massenspektrometrisch zu klären (B 4.3), erwies sich die Interpretation der Ergebnisse meist als schwierig (siehe Diskussion). Daher wurde das bisher als Substrat der α -Benzylmalat-Synthase verwendete L-Phenylalanin-4-³H durch L-Phenylalanin-U-¹⁴C (spez. Akt. 10 mCi/mMol, Amersham) ersetzt. Wesentliche Grundzüge der Aufarbeitungstechniken (gel-chromatographische Trennung B 2.5.1) blieben erhalten; es wurden lediglich einzelne Verfahrensschritte geändert. Eine Variation dieses Auftrennungsverfahrens bestand darin, die Präparation (B 2.2 a)) vor der gelchromatographischen Trennung über Sephadex G-50 einer Zentrifugation bei max. 26.000xg (15 min) zu unterwerfen und lediglich den Überstand gelchromatographisch aufzutrennen.

Als weitere Abwandlung dieser Methode wurde der Rohextrakt zunächst bei max. 39.000xg zentrifugiert und der Überstand über eine Sephadex G-100-Säule fraktioniert. Die Fraktionen wurden halbiert und eine Hälfte wie in B 2.5.1 (gelchromatographische Trennung) mit je 50 μ Ci L-Phenylalanin-U-¹⁴C (spez. Akt. 10 mCi/mMol) 30 min inkubiert. Die andere Hälfte der Fraktionen wurden mit β -Benzyläpfelsäure-1,2-¹⁴C (B 3.1) (10 μ Ci, spez. Akt. 1 mCi/mMol, Anfangskonzentration 3×10^{-4} M) und NAD^+ (10^{-3} M) 30 min bei Zimmertemperatur geschüttelt. Die Inkubationen wurden durch Zugabe von Träger und konz. HCl abgebrochen, sechsmal ausgeäthert und die Ätherextrakte papierchromatographisch weiter charakterisiert (B 4.1, Laufmittel A).

Bei der Aufarbeitung großer Blattmengen (bis zu 40 g) wurde zur Ankonzentrierung der großen Überstandsvolumina nach einer Zentrifugation bei 39.000xg eine Ammoniumsulfatfällung (B 4.5) durchgeführt, das gefällte Protein 15 min bei 26.000xg abzentrifugiert und der Niederschlag in Puffer C aufgenommen. Zur Entsalzung und groben Auftrennung wurde die Proteinlösung auf eine Sephadex G-50-Säule aufgetragen, fraktioniert und mit 50 μ Ci L-Phenylalanin-U- ^{14}C * 30 min inkubiert. Zur Molekulargewichtsbestimmung wurde eine kalibrierte Sephadex G-100-Säule eingesetzt (B 4.4 b)).

* (spez. Akt. 10 mCi/mMol)

3. Synthesen

3.1 Synthese von β -Benzyläpfelsäure-1,2- ^{14}C

Die Synthese von β -Benzyläpfelsäure-1,2- ^{14}C wurde bereits von Underhill ¹⁵⁾ nach der Methode von Horii ³¹⁾ durchgeführt. In der hier vorgestellten Arbeitsvorschrift wurden Änderungen bei der Reduktion des 2-Keto-3-benzylbernsteinsäurediäthylesters, die destillative Reinigung des Oxalsäurediäthylesters- ^{14}C und eine Vereinfachung der Synthese durch die direkte Aneinanderkopplung der Reaktionen von Oxalsäurediäthylester bis zum β -Benzyläpfelsäurediäthylester ohne Isolierung des Zwischenprodukts neu eingeführt. Außerdem konnte durch eine geringere Verdünnung der eingesetzten Radioaktivität und einer damit verbundenen Verkleinerung der Substanzmengen eine Erhöhung der spezifischen Aktivität auf das 7-fache erreicht werden.

Im einzelnen wurde wie folgt verfahren:

32 mg Oxalsäure- ^{14}C ($1/3 \text{ mMol} \hat{=} 1 \text{ mCi}$, spez. Akt. 3 mCi/mMol, NEN) wurden mit 58 mg wasserfreier Oxalsäure ($2/3 \text{ mMol}$) in 2 ml absolutem Äthanol gelöst und zur Veresterung mit 33 mg p-Toluolsulfonsäure 2 h unter Rückflußkühlung gekocht.

Zur Trocknung des gebildeten Oxalsäurediäthylesters- ^{14}C und zur Abtrennung von p-Toluolsulfonsäure wurde das Produkt (ca. $130\ \mu\text{l}$) im Vakuum bei 10^{-3} Torr destilliert. Dazu wurde folgende Apparatur verwendet (schematisch):

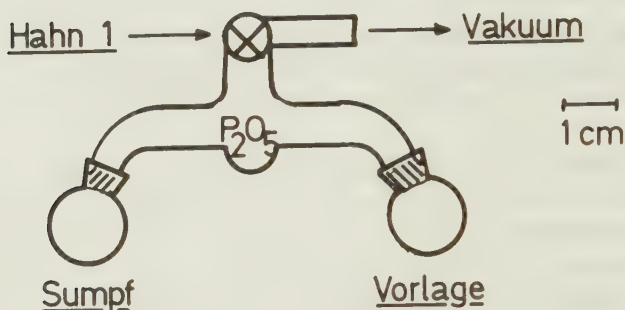


Abbildung 1

Apparatur zur Mikrodestillation

Bei der Destillation wurde wie folgt verfahren:
Zunächst wurde der Sumpf mit flüssigem Stickstoff gekühlt und ein Vakuum von ca. 10^{-3} Torr eingestellt. Bei diesem Druck wurde die Apparatur mittels Hahn 1 verschlossen und die Vorlage ebenfalls mit flüssigem Stickstoff gekühlt. Anschließend wurde der Sumpf langsam auf Zimmertemperatur erwärmt, wobei der Oxalsäurediäthylester überdestillierte und über P_2O_5 getrocknet wurde. Um die Destillation zu vervollständigen, wurde der Sumpf noch leicht erwärmt. Dieses Verfahren hatte sich nach mehreren verschiedenen Vorversuchen als günstig erwiesen, da eine Abtrennung des Oxalsäurediäthylesters von der p-Toluolsulfonsäure vor dem nächsten Reaktionsschritt ebenso unabdingbar war wie eine möglichst gute Trocknung des Diesters.

Die radiochemische Ausbeute an Oxalsäurediäthylester- ^{14}C betrug ca. $950\ \mu\text{Ci} \approx 95\%$ des theoretischen Wertes ($0,95\ \text{mmol}$) (gaschromatographische Trennung, Messung der Radioaktivität, B 4.3, 4.5)

Der destillierte Oxalsäurediäthylester- ^{14}C wurde mit 200 μl (1,18 mMol) trockenem 3-Phenylpropionsäureäthylester und 1 ml Natriummethylat (80 mg Na/ml Methanol) versetzt und bei 50 $^{\circ}\text{C}$ und ca. 50 Torr unter Feuchtigkeitsausschluß am Rotavapor gehalten bis eine gelbbraune Färbung und eine Verfestigung des Reaktionsgemisches eintraten. Wie verschiedene Vorversuche gezeigt hatten, erwies sich eine Reinigung des gebildeten 2-Keto-3-benzylbernsteinsäurediäthylesters-1,2- ^{14}C für die weitere Umsetzung als unnötig.

Der nach dem Erkalten feste Rückstand wurde in 6 ml Wasser/Methanol 1:1 (v/v) aufgenommen und mit NaBH_4 im Überschuß versetzt. Es wurde 24 h gerührt, wobei weiter NaBH_4 hinzugefügt wurde bis eine Entfärbung der vorher braungelben Lösung bis zu einer schwachgelben Färbung erfolgt war. Das Reaktionsgemisch wurde mit HCl angesäuert und bis zur Überführung der Hauptaktivitätsmenge in die organische Phase zwölfmal ausgeäthert.

Alternativ war versucht worden, die Reduktion mit NaH in Xylol durchzuführen. Die Reduktion mit NaH erwies sich jedoch als ungünstiger.

Die radiochemische Ausbeute an β -Benzyläpfelsäurediäthylester-1,2- ^{14}C (Rohprodukt) betrug ca. 820 $\mu\text{Ci} \hat{=} 82\%$ der eingesetzten Radioaktivität.

Nach Abrotieren des Äthers wurde das ungereinigte Rohprodukt in Methanol/4N NaOH 1:2 (v/v) gelöst und 18 h unter Rückflußkühlung gekocht. Das Reaktionsgemisch wurde dann angesäuert, sechzehnmal ausgeäthert und der eingeeengte Ätherextrakt der etwa 74 % der eingesetzten Aktivität enthielt in Methanol aufgenommen. Das Reaktionsgemisch wurde auf zwei DC-Platten (20 x 20 cm; 2 mm Schichtdicke) aufgetragen und in Benzol-Eisessig (B 4.2) aufgetrennt. Die β -Benzyläpfelsäurezone wurde von der Dünnschichtplatte abgekratzt und mit heißem Methanol eluiert. Die Radioaktivität im Eluat betrug ca. 100 $\mu\text{Ci} \hat{=} 10\%$ der eingesetzten Aktivität.

Die radiochemische Ausbeute über alle Reaktionsstufen betrug demnach 10 % des theoretischen Wertes. An Produkt konnten 22 mg β -Benzyläpfelsäure-1,2- ^{14}C mit einer spezifischen Aktivität von 4,45 $\mu\text{Ci/mg} \hat{=} 1 \text{ mCi/mMol}$ gewonnen werden.

3.2 Darstellung von Acetylphosphat-2- ^{14}C

Die Synthese entspricht bei leichten Abwandlungen und Verkleinerung des Maßstabs der Vorschrift von Avison.²⁰⁾

30 mg K_2HPO_4 (0,17 mmol) wurden mit 250 μl H_2O und 120 μl Pyridin unter Eiskühlung zu einer homogenen Lösung geschüttelt. Diese Lösung wurde in eine Ampulle, die 0,068 mmol (1 mCi) Acetanhydrid-1- ^{14}C (spez. Akt. 14,9 mCi/mmol) enthielt, überführt und unter Kühlen und weiterem Schütteln 12 μl (0,127 mmol) Acetanhydrid portionsweise über einen Zeitraum von 4 min zugetropft. Nach 80 min im Eisbad wurden 100 μl 4N LiOH zugegeben und 4-5 ml Äthanol zur Fällung des Li-Acetylphosphats-2- ^{14}C zugesetzt. Die Mischung wurde 24 h bei 4 $^{\circ}\text{C}$ stehengelassen und das ausgefallene Li-Acetylphosphat-2- ^{14}C mit einer Tischzentrifuge sedimentiert. Anschließend wurde das Präzipitat mehrfach mit eiskaltem Äthanol gewaschen, wieder zentrifugiert und im Vakuum getrocknet.

Die Ausbeute betrug 22,8 mg an Rohprodukt (spez. Akt. 4,4 $\mu\text{Ci}/\text{mg}$ $\pm$ 615 $\mu\text{Ci}/\text{mmol}$). Die radiochemische Ausbeute betrug 10 % des theoretischen Wertes. Der Gehalt an Acetylphosphat wurde zusätzlich photometrisch bestimmt.²¹⁾

3.3 Enzymatische Synthese von Acetyl-Coenzym A-2- ^{14}C

Das Darstellungsverfahren wurde aus einem photometrischen Test für Phosphotransacetylase (P.T.A. 2.3.1.8) entwickelt.²¹⁾

Zu 2 mg Acetylphosphat-2- ^{14}C (12 μmol , 5,8 μCi , spez. Akt. 4,4 $\mu\text{Ci}/\text{mg}$), 8,5 mg Coenzym A (11 μmol) und 1,2 mg Glutathion (red., 4 μmol), gelöst in 500 μl 0,1 M Tris-HCl-Puffer, pH 7,4, wurden 10 μl 1 M Ammoniumsulfatlösung und 100 μg Phosphotransacetylase (P.T.A., Clostridium kluyveri, 1000 U/mg) gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 30 min bei Zimmertemperatur inkubiert, anschließend auf 1-2 Bogen MN18 (Macherey und Nagel) aufgetragen und das Chromatogramm in Laufmittel C (B 4.

entwickelt (Rf Acetyl-Coenzym A = 0,61).

Die radiochemische Ausbeute an Acetyl-Coenzym A-2-¹⁴C lag zwischen 30 und 50 % des theoretischen Wertes $\hat{=}$ 8-12 μ Mol/h.

Für die Anwendung von Acetyl-Coenzym A-2-¹⁴C in späteren Inkubationen mit zellfreien Extrakten aus N. officinale wurden die eingesetzten Mengen der Reaktionspartner den Versuchsvoraussetzungen (gewünschte Anfangskonzentration bei der Inkubation) entsprechend verändert und auf eine papierchromatographische Auftrennung des Reaktionsgemisches verzichtet um Ausbeuteverluste durch Zersetzung des Acetyl-Coenzym A bei der Chromatographie und Isolierung zu vermeiden. Das Reaktionsgemisch zur Acetyl-Coenzym A-Bildung wurde dazu vor der Zugabe der zu testenden Fraktionen vorinkubiert und erst dann weitere Reaktionspartner und die zellfreien Extrakte zugesetzt (B 2.3).

4. Chromatographische Methoden

4.1 Papierchromatographie

Da in der Regel präparativ zu trennen war, kam für die papierchromatographischen Trennungen ausschließlich dickes Papier (MN218, Macherey und Nagel) zur Anwendung.

Als Laufmittel wurden folgende Systeme eingesetzt:

System A: Benzol/Eisessig/Wasser 4: 2 : 1 (obere Phase)

System B: n-Butanol/NH₃-konz. Äthanol/Wasser 5 : 3 : 2 : 1

System C: Isopropanol/Pyridin/Wasser 1 : 1 : 1

(Alle Angaben sind v/v-Werte)

Zur Isolierung der Benzyläpfelsäuren, die sich in den Inkubationsansätzen gebildet hatten, wurden System A und B verwendet. Da sich in System A Phenylalanin und verschiedene Reaktionsprodukte hoher Radioaktivität gut von den Benzyläpfelsäuren trennten, wurde es zuerst eingesetzt. System B diente zur weiteren Auftrennung der Komponenten, die in Laufmittel A gleiches oder sehr ähnliches Laufverhalten wie die Benzyläpfelsäuren zeigten. Für System A wurde

ein Verfahren zur UV-optischen Markierung der Benzyl-äpfelsäuren ausgearbeitet, wobei Gentisinsäure und Umbelliferon als Testverbindungen mitliefen und aufgrund ihrer Fluoreszenz eine gut sichtbare Eingrenzung der Benzyläpfelsäuren erlaubten. In System B wurde ein Gemisch aus α - und β -Benzyläpfelsäure als Marker verwendet, das durch Aufsprühen von schwach ammoniakalischem Methylrot (2 % in Äthanol) sichtbar gemacht werden konnte. α -Benzyläpfelsäure-2- ^{14}C diente auf einem Teststreifen in beiden Systemen als radiochemischer Marker. Das Eluieren der Benzyläpfelsäurezonen erfolgte mit heißem Methanol.

Für die genannten Substanzen und weitere Testverbindungen ergaben sich folgende Rf-Werte:

System A

Substanz	Rf-Wert
Phenylalanin	0 - 0,05
Gentisinsäure	0,11
α - und β -Benzyläpfelsäure	0,17
Umbelliferon	0,22
2-Keto-4-phenylbuttersäure	0,65

Tabelle 1

System B

Substanz	Rf-Wert
α - und β -Benzyläpfelsäure	0,33
Phenylalanin	0,56
2-Keto-4-phenylbuttersäure	0,67
p-Nitrophenol	0,69

Tabelle 2

System C wurde zur Identifizierung des Reaktionsproduktes bei der enzymatischen Synthese von markiertem Acetyl-Coenzym A herangezogen. Als Vergleichssubstanzen dienten dabei Glutathion (red., GSH), Coenzym A und inaktives Acetyl-Coenzym A. Außerdem wurde das bei der Reaktion entstehende Acetat bestimmt.

Es wurden folgende Rf-Werte ermittelt:

System C

Substanz	Rf-Wert
GSH (red.)	0,54
Acetyl-Coenzym A	0,61
Coenzym A	0,66
Acetat	0,75

Tabelle 3

4.2 Dünnschichtchromatographie

Dünnschichtchromatographische Verfahren wurden nur bei der Synthese von β -Benzyläpfelsäure-1,2- ^{14}C (B 3.1) zur präparativen Trennung des Endproduktes von Nebenprodukten verwendet. Es wurden dabei Fertigplatten mit Fluoreszenzindikator (Merck, Kieselgel F254, 2 mm Schichtdicke, 20 x 20 cm) eingesetzt.

Als Laufmittel diente ein Lösungsmittelgemisch aus Benzol und Eisessig im Verhältnis 5:1 (v/v).

Folgende Rf-Werte wurden ermittelt:

Substanz	Rf-Wert
Oxalsäure	0
α -Benzyläpfelsäure	0,22
β -Benzyläpfelsäure	0,22
weitere nicht identifizierte Nebenprodukte	0,4-1

Tabelle 4

Versuche, die bei der Synthese von β -Benzyläpfelsäure-1,2- ^{14}C gebildeten Zwischenstufen dünnenschichtchromatographisch quantitativ in Laufmittelgemischen wie Benzol/Essigester 4:1 (v/v) oder Methylenchlorid/Petroläther 5:1 (v/v) zu bestimmen, erwiesen sich als untauglich. Eine DC-Reinigung der Zwischenstufen war unnötig (B 3.1). Die quantitative Bestimmung der Ausbeute in den einzelnen Synthesestufen wurde gaschromatographisch durchgeführt (B 4.3).

4.3 Analytische und präparative Gaschromatographie

Für die gaschromatographischen Untersuchungen wurde ein Varian Aerograph, Series 2800 Moduline mit multilinearem Temperaturprogrammteil, variablem Split, heizbarem Kollektorauslaß und Flammenionisationsdetektor verwendet.

Trägergas:	N ₂ ,	Durchflußgeschwindigkeit 30 ml/min
Verbrennungsgase:	H ₂ ,	Durchflußgeschwindigkeit 30 ml/min
	Pressluft,	Durchflußgeschwindigkeit 300 ml/min
Betriebstemperaturen:	Detektor :	290 - 300 °C
	Injektor :	200 °C (120 °C)
	Kollektor:	200 °C

Die verwendeten Säulenmäntel bestanden aus Edelstahl mit einem Innendurchmesser von 1/8 Zoll.

Eingesetzte Säulenmaterialien (Werner Günther, Analystechnik):

- I. 15 % Carbowax 20M PTA auf Chromosorb WAW, 60/80 mesh
- II. 3 % (10 %) Silikon OV 17 auf Chromosorb W-HP, 100/120 mesh

Zur gaschromatographischen Trennung und Identifizierung von α - und β -Benzyläpfelsäure¹⁶⁾ wurde die Benzyläpfelsäurezone nach der papierchromatographischen Reinigung mit Methanol vom Papier eluiert und das Lösungsmittel abgedampft. Der Rückstand wurde mit je 2 mg α - und β -Benzyläpfelsäure als Träger versetzt und mit einem Überschuß an Diazomethan in Äther zu den methylierten Produkten umgesetzt. Es war notwendig, Diazomethan als Methylierungsmittel einzusetzen, da handelsübliche Reagenzien, wie Methyl 8 (Dimethylformamid-dimethylacetal, Pierce Chemical Comp.) und Meth-Elute (Trimethylaniliniumhydroxid, Pierce) nur sehr unvollständig methylierten bzw. die stationäre Phase des Säulenmaterials irreversibel zerstörten. Auch der Versuch, α - und β -Benzyläpfelsäure gaschromatographisch als Silylderivate zu trennen, brachte unabhängig vom verwendeten Säulenmaterial und Temperaturprogramm kein befriedigendes Ergebnis. Die methylierten Derivate der Benzyläpfelsäuren ließen sich dagegen mit Säulenmaterial I gut trennen. Dabei wurde durch

Variation verschiedener Parameter am Gaschromatographen (Anfangstemperatur des Programms, multilinearer Temperaturgradient) eine ausreichende Trennung erreicht. Die Fraktionen (Substanzpeaks und Zwischenfraktionen) wurden in Szintillationsgefäßen (15 ml Szintillatorflüssigkeit (B 4.5 a)) aufgefangen und die Aktivität im Flüssigkeits-szintillationszähler bestimmt (B 4.5). Zur eindeutigen Identifizierung von β -Benzyläpfelsäure-3- ^{14}C nach der Inkubation mit α -Benzyläpfelsäure-2- ^{14}C wurde der β -Benzyläpfelsäurepeak durch mehrfaches Einspritzen der Ausgangslösung und Auffangen in Methanol angereichert und anschließend unter gleichen Bedingungen wie vorher rechromatographiert und die Radioaktivität bestimmt.

Anders als bei der oben beschriebenen Verfahrensweise konnte das Schwergewicht der Untersuchungen nach der Inkubation mit L-Phenylalanin-4- ^3H oder Acetyl-Coenzym A-2- ^{14}C wegen der äußerst geringen Umsätze nicht in der Trennung von α - und β -Benzyläpfelsäure liegen, sondern die gemeinsame Identifizierung beider Benzyläpfelsäuren mußte in der Mehrzahl der Fälle im Vordergrund stehen. Dazu wurde das eingedampfte Methanoleluat aus der zweiten papierchromatographischen Reinigung (B 4.1, A,B) mit je 1 mg α - und β -Benzyläpfelsäure als Träger versetzt und in 1 ml-Silyliergefäße überführt. Um letzte Feuchtigkeitsreste zu entfernen, wurde viermal Methylenchlorid als Entwässerungsmittel zugesetzt. Das Methylenchlorid wurde mit erwärmtem Stickstoff unter IR-Bestrahlung abgedampft.¹⁶⁾ Die getrockneten Substanzen wurden mit MSTFA (N-Methyl-N-trimethylsilyl-trifluoracetamid, Kp. 132 °C, Macherey und Nagel) versetzt, die Silyliergefäße versiegelt und 30 min bei 120 °C gehalten.

Für die präparative Trennung wurde Säulentyp II (B 4.3, Länge 1,5 m) verwendet. Wegen der relativ geringen Aktivität unter dem Benzyläpfelsäurepeak wurde die Peakfraktion zur Anreicherung mehrfach in Methanol aufgefangen, neu silyliert und unter gleichen Bedingungen rechromatographiert.

Da bei der Rechromatographie der in Methanol aufgefangenen Silylderivate der Benzyläpfelsäurefraktion aus Inkubationen mit L-Phenylalanin-4- ^3H die Radioaktivität verschmiert war

und ein völlig reproduzierbares Spektrum von Nebenpeaks entstand, wurde versucht, diese neu auftretenden Peaks durch ein kombiniertes GC-Massenspektrum näher zu charakterisieren bzw. sie als Zerfallsprodukte der Benzyläpfelsäuren zu identifizieren.

Für die GC-Massenspektrometrie stand ein Varian Aerograph, Series 2700, mit direkt gekoppeltem Massenspektrometer Varian MAT 711 zur Verfügung. Im gaschromatographischen Teil der Untersuchungen änderten sich die Parameter gegenüber den rein gaschromatographischen Trennungen nur geringfügig. So wurde die gleiche Säule (Typ II, B 4.3, 1,5 m) verwendet, die Injektortemperatur betrug ebenfalls 200 °C, die Detektortemperatur betrug abweichend 200 °C. Das Temperaturprogramm mußte aus apparativen Gründen leicht modifiziert werden, größere Abweichungen ergaben sich nur bei folgenden Parametern: Als Trägergas wurde Helium verwendet, die Durchflußgeschwindigkeit war unter den Bedingungen bei der Probentrennung nicht bestimmbar, da am Säulenende Vacuum anlag.

Das Massenspektrometer war so programmiert, daß parallel zum Gaschromatogramm das Auftreten von Peaks der Masse $M = 91$ (Tropylum-Kation), einem charakteristischen Bruchstück von Aromaten mit Alkylseitenkette, angezeigt wurde.

Beim analytischen Nachweis der verschiedenen Zwischenprodukte bei der Synthese von β -Benzyläpfelsäure- $1,2\text{-}^{14}\text{C}$ und bei den dazu durchgeführten Vorversuchen wurde ausschließlich Säulentyp I (B 4.3, Länge 1 m) eingesetzt. Dabei ergaben sich, bezogen auf den Standard Dihydrozimtsäure für die Zwischen- und Ausgangsprodukte der Synthese folgende relative Retentionszeiten (RRT):

Substanz	RRT
Oxalsäurediäthylester	0,06
Dihydrozimtsäureäthylester	0,31
2-Keto-3-benzylbernsteinsäurediäthylester	0,35
2-Keto-3-benzylbernsteinsäurediäthylester nach Red. mit Na BH ₄	0,43
Dihydrozimtsäure	1,00
α-Benzyläpfelsäuredimethylester (Test)	1,06
β-Benzyläpfelsäuredimethylester	1,22

Tabelle 5

4.4 Proteintrennungen

Bei den gelchromatographischen Proteintrennungen kamen Sephadex G-50 (medium) und Sephadex G-100 (medium) zur Anwendung.

a) Sephadex G-50 wurde nur für grobe Vortrennungen von Rohhomogenaten, Zentrifugationsüberständen und zur Entsalzung nach Ammoniumsulfatfällungen verwendet.

Säulenabmessungen:	1,3 x 25 cm
Bettvolumen:	28 ml
Totvolumen (Dextranblau):	9 ml
Niedermolekulare Substanzen (Bromphenolblau):	27 ml

Das Gel wurde mit Puffer C equilibriert.

Das Kalibrieren der Säule erfolgte mit Katalase aus Rinderleber (E.C. 1.11.1.6) und Peroxidase aus Meerrettich (E.C. 1.11.1.7). Ein exakteres Kalibrieren erübrigte sich, da die aufzutrennenden Homogenate und Ammoniumsulfatfällungen im Verhältnis zum Bettvolumen sehr große Volumina hatten und deshalb nur eine grobe Auftrennung der Proteine erreicht werden konnte.

b) Sephadex G-100 wurde zur exakteren Auftrennung von zentrifugierten Rohextrakten und Ammoniumsulfatfällungen verwendet.

Säulenabmessungen:	2,8 x 40 cm
Bettvolumen:	190 ml
Totvolumen (Dextranblau):	65 ml
Niedermolekulare Substanzen (Bromphenolblau):	180 ml

Das Gel wurde mit Puffer C equilibriert. Die Säule wurde mit mehreren Proteinen und weiteren Molekulargewichtsmarkern kalibriert.

Molekulargewichtsmarker	Elutionsvolumen (ml)	Rf	Molekulargewicht
Dextranblau	0	0	$> 10^5$
Uricase (Schweineleber) (E.C. 1.7.3.3)	3	0,043	100.000
Malatdehydrogenase (Schweineherz, mitochondrial) (E.C. 1.1.1.37)	15	0,217	70.000
α -Amylase (Aspergillus oryzae) (E.C. 3.2.1.1)	24	0,348	52.000
Peroxidase (Meerrettich) (E.C. 1.11.1.7)	30	0,435	40.000
Cytochrom c	69	1,0	12.500
Bromphenolblau	180	2,608	< 1.000

Tabelle 6

Die Extinktionsmessungen für Dextranblau erfolgten bei 280 nm, für Bromphenolblau bei 260 nm.

Die Enzymtests erfolgten nach den in der Literatur angegebenen Testvorschriften: Uricase ²²⁾, Malatdehydrogenase ²³⁾, α -Amylase ²⁴⁾, Peroxidase ²⁵⁾.

Cytochrom c wurde anhand seiner Extinktion bei 410 nm bestimmt.

c) Nach der Zentrifugation von Rohextrakten wurden zur Ankonzentrierung des Proteins in den Überstandsfractionen Ammoniumsulfatfällungen bis zu 80 %iger Sättigung durchgeführt. Um eine pH-Änderung in den Homogenaten zu vermeiden, erfolgten die Fällungen mit gesättigter Ammoniumsulfatlösung, die in Puffer C angesetzt wurde. Die Fällungen wurden bei 4 °C unter portionsweiser Zugabe des Fällungsmittels über einen Zeitraum von ca. 30 min und anschließend 60-minütigem Rühren durchgeführt. Der Niederschlag wurde bei max. 26.-39.000xg 10 min abzentrifugiert und in Puffer C aufgenommen.

4.5 Reinheitsprüfung und Bestimmung der markierten Verbindungen

Zur Bestimmung der Radioaktivität in Lösungen stand ein Flüssigkeitsszintillationszähler (Packard-Tri-Carb-Liquid-Scintillation Spectrometer, Model 3380 mit Rechneinheit 544) zur Verfügung. Mit der Rechneinheit wurden absolute Aktivitäten (dpm = desintegrations per minute) nach der Methode des externen Standardkanalverhältnisses ermittelt. Als Szintillatorflüssigkeit wurden zwei Systeme verwendet:

a) organische Lösungen:

5 g Butyl-PBD (2-(4-tert.-butylphenyl)-5-(4-biphenyl)-1,3,4-oxadiazol (Scintill. Grade, Packard bzw. Zinser) in 1.000 ml Toluol.

b) wäßrige Lösungen:

5 g Butyl-PBD
200 ml Scintisol G.P. (Isolab)
in 1.000 ml Toluol.

Zur Lokalisierung radioaktiver Zonen auf Papierchromatogrammen stand ein Papierchromatogrammscanner (Packard, Radiogramm-scanner, Model 7201, Meßkopf: 4 π -Anordnung; Meßgas: Helium/Isobutan) zur Verfügung.

Dünnschichtchromatogramme wurden mit einem DC-Scanner (Berthold, DC-Scanner II; LB 2723; Meßeinheit LB 241K; Meßkopf: 2 π -Anordnung; Meßgas: Methan) ausgewertet.

Da bei der gaschromatischen Charakterisierung der Benzyläpfelsäuren aus L-Phenylalanin-4-³H Schwierigkeiten bei der eindeutigen Identifizierung der Radioaktivität entstanden, wurde bei einem Teil dieser Untersuchungen sowie bei allen Versuchen mit L-Phenylalanin-9-¹⁴C auf eine gaschromatographische Identifizierung verzichtet. Statt dessen wurde nach zweifacher Papierchromatographie (S 4.1) bis zur konstanten spezifischen Aktivität umkristallisiert. Dabei wurde je nach Menge der Radioaktivität mit 100-200 mg inaktivem Träger (α - und β -Benzyläpfelsäure) verdünnt und vier- bis sechsmal aus Essigester-Petroläther umkristallisiert. Dazu wurde die Probe in möglichst wenig heißem Essigester gelöst und nach dem Erkalten mit Petroläther bis zur schwachen Trübung versetzt. Nach 4 - 6 h bei -20 °C wurden die Kristalle von der Mutterlauge getrennt und getrocknet. Die Radioaktivitätsbestimmung eines Aliquots (6 - 10 mg) erfolgte im Flüssigkeitsszintillationszähler.

4.6 Weitere quantitative Bestimmungen

Proteinbestimmungen wurden nach Lowry et al. ¹⁸⁾ durchgeführt, wobei unter einer maximalen Proteinkonzentration von 200 µg/ml gearbeitet wurde. Bei Anwesenheit von störenden Reagenzien (Reduktionsmittel, hohe Saccharosekonzentrationen) wurde zunächst eine Trichloressigsäurefällung (TCA) durchgeführt, wobei mit 15 %iger TCA-Lösung bis zu einer Endkonzentration von ca. 7 % in den Proben das Protein gefällt wurde. Zur Vervollständigung der Fällung wurden die Proben etwa 4 h bei 4 °C gehalten und anschließend mit einer Tischzentrifuge sedimentiert. Nach dem Lösen in Puffer wurde die Extinktion bei 710 nm mit einem Photometer (PMQII, III; Zeiss) gemessen.

Das Chlorophyll wurde mit einem Gemisch aus Aceton und 0,95 M wäßriger NH₃-Lösung (80/20, v/v) extrahiert und die Extinktionen der Extrakte photometrisch bei 750, 664 und 647 nm (PMQII; Zeiss) bestimmt. Der Chlorophyllgehalt wurde nach folgender Gleichung berechnet: ¹⁹⁾

$$\text{Chlorophyll a} = 11,78 \times E_{664} - 2,29 \times E_{647}$$

$$\text{Chlorophyll b} = 20,05 \times E_{647} - 4,77 \times E_{664}$$

Die Saccharosekonzentrationen in den Gradientenfraktionen wurden refraktometrisch bestimmt (Refraktometer mit %-Saccharose-Skala) und verstehen sich als Gewichtsprozente (w/w). Zur Bestimmung der Schwebedichte der Partikelfractionen wurden die Prozentzahlen der Saccharosekonzentrationen in Saccharosedichten umgerechnet. ²⁷⁾

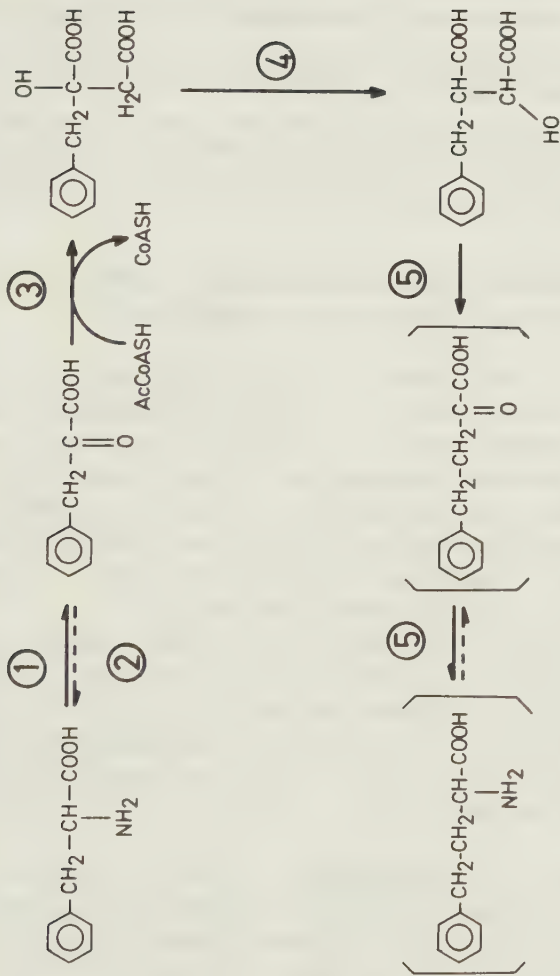
C. Ergebnisse

Die Versuchsergebnisse werden in zwei Gruppen zusammengefaßt: Teil 1 mit den Versuchen zum Nachweis und zur Charakterisierung des "condensing enzyme" (α -Benzylmalat-Synthase) dem Nachweis einer α -Benzylmalat-Isomeraseaktivität und der anschließenden Oxidation und Decarboxylierung zu 2-Keto-4-phenylbutyrat in vitro und Teil 2 mit den Synthesen von radioaktiven Substraten.

Schließlich werden die Ergebnisse der GC-massenspektrometrischen Zuordnungen besprochen.

1. Übersichtsschema der untersuchten Reaktionssequenz

Zur Verdeutlichung der in Abschnitt C 1. beschriebenen Ergebnisse soll eine schematische Darstellung der untersuchten Reaktionsschritte den eigentlichen Versuchen vorangestellt werden.



Schema 3:

Reaktionsschema der untersuchten Kettenverlängerung von Phenylalanin.

Für die Untersuchung der verschiedenen hier gestellten Fragen wurden von der methodischen Seite her drei Versuchsführungen ausgewählt:

- a) Reaktion 4 durch Vorgabe von radioaktiver α -oder β -Benzyl-äpfelsäure
- b) Reaktion 3 durch Inkubation von radioaktivem Acetyl-Coenzym A mit inaktivem Phenylpyruvat sowie
- c) Reaktion 3 durch Umsatz von inaktivem Acetyl-Coenzym A mit radioaktivem Phenylpyruvat, das im Reaktionsansatz aus radioaktivem Phenylalanin mit Hilfe eines Hilfsenzym (Reaktion 1, LAOD) entsteht. Unter *in vivo*-Bedingungen wäre wohl mit einer Transaminase (Reaktion 2) zu rechnen.

1.1 Nachweis einer α -Benzylmalat-Isomeraseaktivität in zellfreien Extrakten aus N. officinale

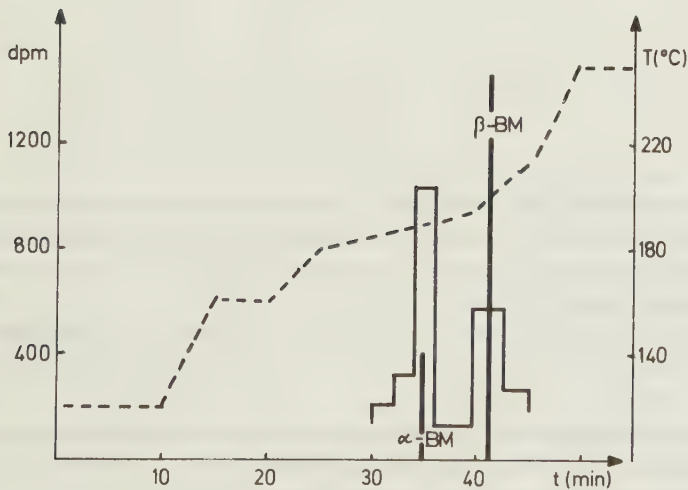
Die Aufarbeitung des Blattmaterials von N. officinale und alle weiteren Schritte erfolgten wie in B 2.4 beschrieben. Vorversuche hatten gezeigt, daß mit sehr kleinen Umsätzen zu rechnen war. Um hohe Proteinkonzentrationen in den Inkubationen zu erreichen, wurden Blattmengen bis zu 40 g Frischgewicht eingesetzt, der Rohextrakt bei 39.000xg zentrifugiert und mit einer Amiconzelle auf 20 ml ankonzentriert. Nach der Inkubation mit je 2,38 μCi (9 μMol) α -Benzyläpfelsäure-2- ^{14}C (spez. Akt. 268 $\mu\text{Ci}/\text{mMol}$) für 30 min und papierchromatographischer Trennung konnten aus den Methanoleluaten der Benzyläpfelsäurepeaks in der Überstandsfraktion $1,26 \times 10^6 \text{ dpm} \hat{=} 0,56 \mu\text{Ci} \hat{=} 24 \%$ der eingesetzten Aktivität und in der Niederschlagsfraktion $3,94 \times 10^6 \text{ dpm} \hat{=} 1,78 \mu\text{Ci} \hat{=} 75 \%$ der eingesetzten Aktivität zurückgewonnen werden.

Nach Methylieren der Dicarbonsäuren und mit Diazomethan zu den Dimethylestern (es wurde nur je ein signifikanter Peak für das α - und β -Benzylmalatderivat gefunden) ergab sich bei der gaschromatographischen Voruntersuchung ein Verhältnis von 10 - 20 : 1 für α - : β -Benzylmalat. Da jedoch die Fraktion zwischen den beiden Isomeren sehr hohe Radioaktivitäten enthielt, war zu vermuten, daß erhebliche Aktivitäten unter dem β -Benzylmalatpeak einer verschmierten Aktivität aus α -Benzylmalat zuzuordnen waren. Das bestätigte sich, wenn nach gaschromatographischer Auftrennung und Auffangen der β -Benzyläpfel-

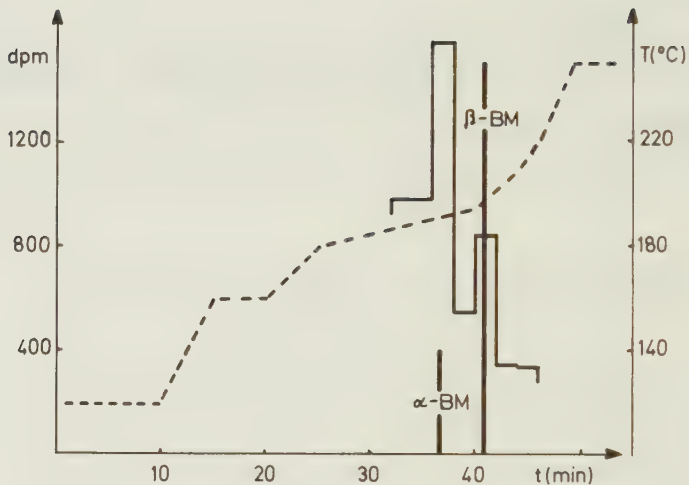
säurezone in Methanol die vorgetrennte Fraktion einer anschließenden Rechromatographie unterworfen wurde.

In den folgenden graphischen Darstellungen werden repräsentative Beispiele von Gaschromatogrammen (Substanzpeaks) mit den gemessenen Radioaktivitäten in den Fraktionen wiedergegeben:

1 a



1 b



Graphische Darstellung 1 a, 1 b:

Radioaktivitäts- und Masseverteilung bei der Rechromatographie nach der gaschromatographischen Trennung von α - und β -Benzylmalat aus Inkubationen von Überstand (1 a) und Niederschlag (1 b) mit α -Benzylmalat-2- ^{14}C .

----- Temperaturgradient, | Intensität der Substanzpeaks



Radioaktivitätsverteilung

Insgesamt ergaben sich aus den gaschromatographischen Trennungen für β -Benzyläpfelsäure Aktivitäten von

7.500 dpm in der Überstandsfraction
und 10.300 dpm in der Niederschlagsfraction.

Bezogen auf die eingesetzte Radioaktivität - unter der Berücksichtigung, daß nur eines der optischen Isomeren der DL- α -Benzyläpfelsäure-2- ^{14}C biologisch verwertbar ist - ergab sich eine Isomerisierungsrate von 0,15 % $\hat{=}$ 27 nMol/h für die Überstandsfraction und 0,2 % $\hat{=}$ 36 nMol/h für die Niederschlagsfraction.

Die gefundenen Ergebnisse erlauben keinen klaren Rückschluß darauf, ob die Isomeraseaktivitäten einem membran-gebundenen oder löslichem Enzym zuzuschreiben sind, allerdings läßt die relativ hohe Isomerisierungsrate in der Membranfraction Spekulationen über eine schwache Assoziation der α -Benzylmalat-Isomerase an eine Membran zu.

Zu bemerken wäre, daß die angegebenen Isomerisierungsraten Minimalwerte darstellen und bei einer weiter verbesserten Analytik u.U. höher einzuschätzen sind.

1.2 Kondensation von Acetyl-Coenzym A-2- ^{14}C mit Phenylpyruvat in zellfreien Homogenaten von B. vulgaris und N. officinale

Homogenate von B. vulgaris und N. officinale wurden, wie in B 2.3 geschildert, mit 20 μCi (32 μMol) Acetylphosphat-2- ^{14}C (spez. Akt. 625 $\mu\text{Ci}/\text{mMol}$) 30 min inkubiert. Da die Inkubationsansätze ein Acetyl-Coenzym A regenerierendes System beinhalteten konnte nach B 3.3 mit der Bildung von 10 - 16 μMol Acetyl-Coenzym A (spez. Akt. 625 $\mu\text{Ci}/\text{mMol}$) während der Inkubationszeit gerechnet werden.

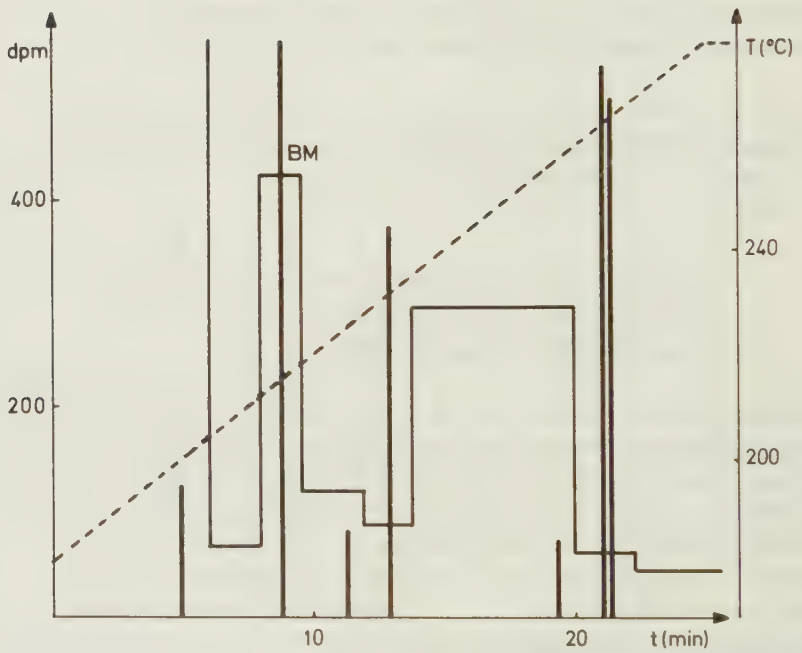
Nach der Aufarbeitung des Enzymansatzes und der papierchromatographischen Trennung ließen sich in den Methanoleluaten der Benzyläpfelsäurezonen folgende Aktivitäten messen:

<u>B. vulgaris</u> :	ca. 37.000 dpm
<u>N. officinale</u> :	ca. 36.000 dpm

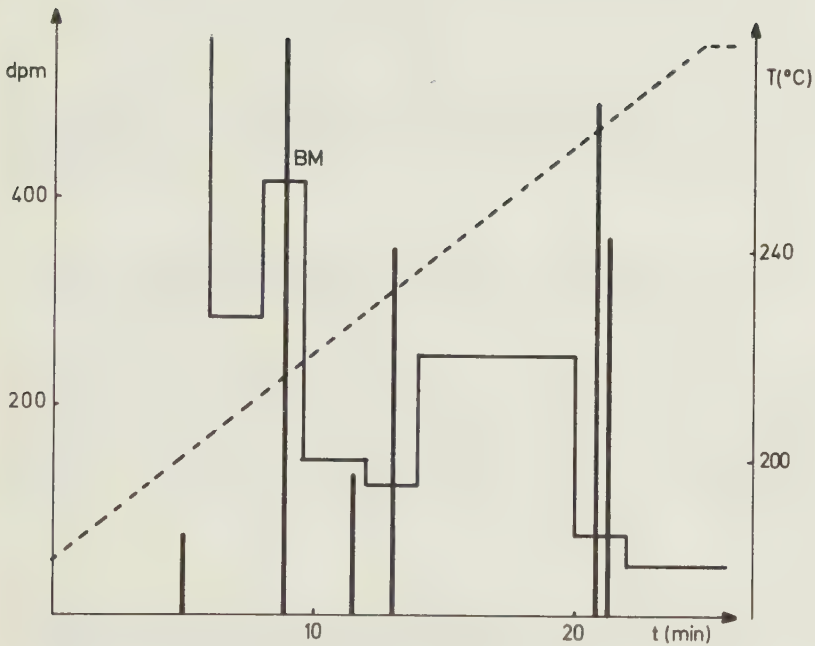
Wegen der geringen Aktivitäten wurde auf eine gaschromatographische Trennung in α - und β -Benzyläpfelsäure verzichtet und eine Mischung der Benzyläpfelsäuren als Silylderivate aufgefangan.

Dabei ergaben sich folgende Radioaktivitätsprofile und Substanzpeaks:

2 a



2 b



Graphische Darstellung 2 a, 2 b:

Radioaktivitäts- und Masseverteilung nach der gaschromatographischen Identifizierung von Benzylmalat aus Inkubationen von Rohextrakten aus B. vulgaris (2 a) und N. officinale (2 b) mit Acetyl-Coenzym A-2- ^{14}C .

----- Temperaturgradient, | Intensität der Substanzpeaks



Radioaktivitätsverteilung.

Daraus errechnet sich die gaschromatographisch isolierbare Radioaktivität unter dem Benzylmalatpeak zu

2.120 dpm $\hat{=}$ 3 nMol/h (B. vulgaris)

und 2.085 dpm $\hat{=}$ 3 nMol/h (N. officinale)

Geht man davon aus, daß während der Inkubation ca. 40 % des eingesetzten Li-Acetylphosphats-2-¹⁴C in Acetyl-Coenzym A-2-¹⁴C eingebaut werden (B 3.3), so ergibt sich in beiden Fällen eine Einbaurate von Acetyl-Coenzym A-2-¹⁴C in Benzylmalat von $1,2 \times 10^{-2} \%$.

Berücksichtigt man, daß das Acetylphosphat-2-¹⁴C als Rohprodukt (B 3.2) eingesetzt wurde, so dürften die tatsächlichen Einbauraten höher einzuschätzen sein.

1.3 Nachweis der Überführung von Phenylpyruvat-4-³H in Benzylmalat durch verschiedene in vitro-Systeme

Eine der offenen Fragen betraf die Lokalisierung der α -Benzylmalat-Synthase in der Zelle. Es wurden dazu verschiedene in vitro-Systeme aus N. officinale (Rohextrakte, Fraktionen aus Differentialzentrifugationen, Eluate aus Gelfiltrationen) mit L-Phenylalanin-4-³H unter Zugabe von L-Aminosäureoxidase inkubiert.

1.3.1 Nachweis von α -Benzylmalat-Synthase- und Isomeraseaktivitäten in Rohextrakten und Membranfraktionen aus N. officinale

Ein Rohextrakt und ein 0 - 150.000xg-Niederschlag (B 2.5.1) aus Blättern von N. officinale wurden mit je 250 μ Ci L-Phenylalanin-4-³H (spez. Akt. 12 Ci/mMol) inkubiert. Die Eluate der papierchromatographisch gereinigten Ätherextrakte enthielten folgende Aktivitäten in der Benzylmalatzone:

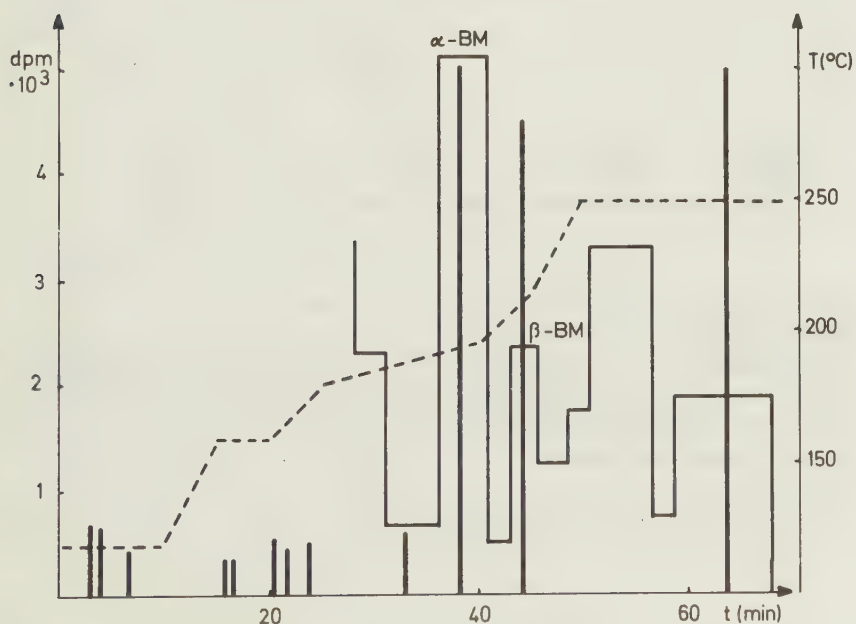
Rohextrakt:	$2,5 \times 10^7$ dpm
0 - 150.000xg-Niederschlag:	$2,3 \times 10^6$ dpm

Gaschromatographische Vorprofile der silylierten Benzylmalat-Eluate (B 4.3) ergaben ein Verhältnis von 10 : 1 für die Radioaktivitätsmengen unter den Benzylmalatpeaks von Rohextrakt und Membranfraktion. Es waren jedoch noch große Aktivitätsmengen über das gesamte Chromatogramm verschmiert, ein Problem, das beim Einsatz von p-tritiiertem Phenylalanin immer wieder auftrat.

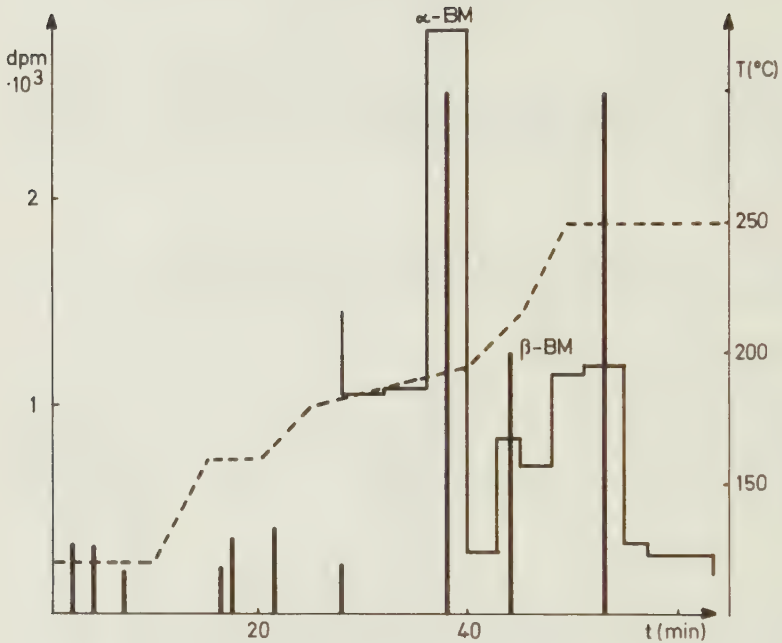
Deshalb wurden die beiden Benzylmalat-Fractionen als Silylderivate gaschromatographisch vorgereinigt und als Dimethylester gaschromatographisch identifiziert.

Die folgenden graphischen Darstellungen geben die Radioaktivitäts- und Masseverteilung bei der gaschromatischen Identifizierung von α - und β -Benzylmalat wieder:

3 a



3 b



Graphische Darstellung 3 a, 3 b:

Radioaktivitäts- und Masseverteilung beim gaschromatographischen Nachweis von α - und β -Benzylmalat aus Inkubationen von Rohextrakt (3 a) und Membranfraktion (3 b) mit L-Phenylalanin-4- ^3H .

----- Temperaturgradient, | Intensität der Substanzpeaks



Radioaktivitätsverteilung.

Aus den gaschromatographischen Untersuchungen errechnen sich, bezogen auf die eingesetzte Radioaktivität, folgende Einzel- und Gesamteinbauraten und -umsätze:

	Rohextrakt	Membranfraktion
dpm α -BM	12.000	6.200
dpm β -BM	6.500	2.300
dpm α - + β -BM	18.500	8.500
Einbau in α -BM(%) ≙ Umsatz (pMol/h)	$2,2 \times 10^{-3} \% \hat{=} 44 \text{ pMol/h}$	$1,1 \times 10^{-3} \% \hat{=} 22 \text{ pMol/h}$
Einbau in β -BM(%) ≙ Umsatz (pMol/h)	$1,2 \times 10^{-3} \% \hat{=} 24 \text{ pMol/h}$	$0,4 \times 10^{-3} \% \hat{=} 8 \text{ pMol/h}$
Einbau in α -u. β -BM ≙ Gesamtumsatz (pMol/h)	$3,4 \times 10^{-3} \% \hat{=} 68 \text{ pMol/h}$	$1,5 \times 10^{-3} \% \hat{=} 30 \text{ pMol/h}$

Tabelle 7

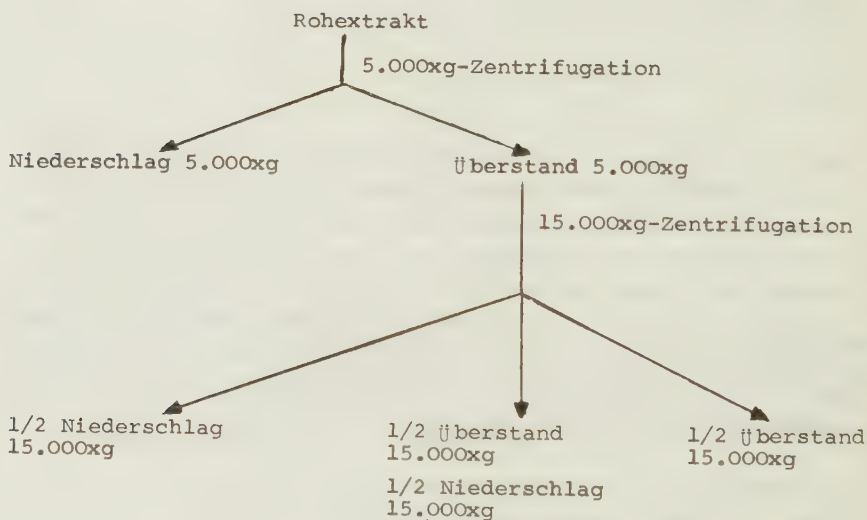
Die für den Einbau von Phenylalanin in α - und β -Benzyläpfelsäure gefundenen Werte belegen eindeutig das Vorhandensein einer α -Benzylmalat-Synthase und einer α -Benzylmalat-Isomerase in beiden Inkubationsansätzen. Eine Aussage über die Lokalisierung der Enzyme in der Zelle ist jedoch aufgrund der Befunde nur sehr schwer möglich, obwohl die relativ hohen Einbauraten in der Membranfraktion eine schwache Assoziation an eine Membran möglich erscheinen läßt. Für die Isomeraseaktivität deckt sich diese Vermutung mit dem Ergebnis aus C 1.1.

Die Bildung von 2-Keto-4-phenylbuttersäure konnte in beiden Fraktionen nicht nachgewiesen werden.

1.3.2 Intrazelluläre Lokalisierung der α -Benzylmalatsynthase

Da die Zielsetzung der Aufarbeitungen nicht nur der Nachweis der Bildung von α -Benzyläpfelsäure aus Phenylpyruvat und die Isomerisierung zu β -Benzylmalat in vitro war, sondern auch die Lokalisierung dieser Enzymaktivitäten in der Zelle beinhaltete, wurde, um mehrintakte Zellorganellen zu erhalten, vom üblichen Homogenisationsverfahren (B 2.2 a)) abgewichen und anstelle dessen mit einem Skalpell auf einem eiskalten Kunststoffblock homogenisiert (B 2.2 b)).

Der Rohextrakt wurde bei 5.000xg und 15.000xg zentrifugiert und nach folgendem Schema mit je 100 μ Ci L-Phenylalanin-4- 3 H (spez. Akt. 12 Ci/mMol) inkubiert.



Schema 4

Inkubationsschema für Inkubationen verschiedener Niederschläge und eines 15.000xg Überstandes sowie einer Kombination aus 15.000xg-Überstand und -Niederschlag mit L-Phenylalanin-4- 3 H.

Nach der papierchromatographischen Reinigung konnten in den Eluatzen der Benzyläpfelsäurezonen zwar noch 5×10^5 - 10^6 dpm je Fraktion gemessen werden, jedoch zeigten sich bei der gaschromatographischen Reinigung (B 4.3) in der 5.000xg und der 15.000xg-Niederschlagsfraktion keine signifikanten Aktivitäten mehr unter dem Benzylmalatpeak (Silylderivat). Die Aktivität war zu 95% im Lösungsmittelpeak enthalten, die restlichen 5 % waren über das gesamte Chromatogramm gleichmäßig verteilt und ließen keine Aussage zu. Bei der kombinierten Inkubation aus 15.000xg-Überstand und -Niederschlag sowie im Inkubationsansatz des 15.000xg-Überstands waren zwar ebenfalls 95% der Radioaktivität im Lösungsmittelpeak enthalten, jedoch konnte ein deutlicher Anstieg der Aktivität unter dem Benzylmalatpeak beider Inkubationen gegenüber dem Untergrund gemessen werden. Aufgrund der insgesamt ungünstigen Radioaktivitätsverteilung soll jedoch auf eine graphische Darstellung und genauere Interpretation des Ergebnisses verzichtet werden. Zu schließen war aus dem Experiment lediglich, daß die Aktivität der α -Benzylmalat-Synthase vermutlich der Überstandsfraktion oder aber der leichten Membranfraktion zuzuordnen ist, was in weiteren Experimenten bestätigt werden konnte.

Um eine bessere Auftrennung der einzelnen Membranfraktionen zu erreichen, wurde wie in B 2.5.1 beschrieben, ein Homogenat in 3.000xg-, 15.000xg-, 150.000xg-Niederschlag und -Überstand fraktioniert. Nach dem Aufnehmen der Niederschläge in 5 ml Puffer B, wurden je 2 ml der Niederschlagssuspensionen und des Überstands mit 50 μ Ci L-Phenylalanin-4- 3 H (spez. Akt. 12 Ci/mMol) inkubiert. 2 ml der 15.000xg- und 150.000xg-Niederschlagssuspension wurden zur Untersuchung ihrer Membranzusammensetzung über einen linearen Saccharosegradienten (25 - 55 %) aufgetrennt. Je 1 ml der Niederschlagssuspensionen und des Überstands wurde für die Protein- und Chlorophyllbestimmungen bereitgestellt.

Die Protein- und Chlorophyllkonzentrationen in den vier Inkubationsansätzen sind in der folgenden Tabelle zusammengefaßt:

	Protein(mg/ml)	Chlorophyll(mg/l)
Rohextrakt	16,0	7,5
3.000xg-Nieder- schlag	16,8	20,8
15.000xg-Nieder- schlag	20,1	21,2
150.000xg-Nieder- schlag	8,3	1,9
Überstand	2,2	1,2

Tabelle 8

Zur Identifizierung der in den Inkubationsansätzen gebildeten Benzyläpfelsäuren wurde nach einer zweifachen papierchromatographischen Reinigung (B 4.1, A, B) eine gaschromatographische Auftrennung der vom Papier eluierten Benzyläpfelsäurefraktionen als Silylderivate durchgeführt. Es zeigte sich, daß die Radioaktivität, die dem papierchromatographischen Verhalten nach Dicarbonsäuren vom Typ des Benzylmalats entsprechen und damit auch gaschromatographisch ein ähnliches Verhalten zeigen sollte, jeweils über das gesamte Chromatogramm verschmiert war. Um trotzdem einen eindeutigen Nachweis für die Bildung von Benzylmalat erbringen zu können, wurde für alle vier Inkubationsansätze eine gaschromatographische Anreicherung der Benzylmalatfraktionen in Methanol durchgeführt.

Die Konzentrate der Benzylmalatfraktionen wurden als Silylderivate rechromatographiert und fraktioniert. Die Radioaktivitätsverteilung bei der gaschromatographischen Fraktionierung der Konzentrate ist für die vier Inkubationen in der folgenden Tabelle wiedergegeben:

Fr.-Nr. (GC)	3.000xg-Fr. (dpm)	15.000xg-Fr. (dpm)	150.000xg-Fr. (dpm)	überstands-Fr. (dpm)	Fraktionsgröße (min)
1	1640	2337	4980	2022	10
2	864	1051	1656	440	4
3	535	802	1453	561	4
4	705	887	1070	482	3
5	504	636	1096	628	3
6	901	1061	1417	897	3 fraktion
7	312	366	768	280	3
8	303	340	627	221	3
9	1588	2106	4055	1334	20

(Fr. = Fraktion)

Tabelle 9

(Benzylmarat-
fraktion)

Daraus ergaben sich für die Inkubationen die folgenden Gesamteinbauraten von L-Phenylalanin-4-³H in Benzylmalat:

3.000xg-Fr.:	2250 dpm	$\hat{=}$	4,0 pMol/h	$\hat{=}$	$1,0 \times 10^{-3}\%$
15.000xg-Fr.:	2650 dpm	$\hat{=}$	4,8 pMol/h	$\hat{=}$	$1,2 \times 10^{-3}\%$
150.000xg-Fr.:	3550 dpm	$\hat{=}$	6,4 pMol/h	$\hat{=}$	$1,6 \times 10^{-3}\%$
Überstand	: 2250 dpm	$\hat{=}$	4,0 pMol/h	$\hat{=}$	$1,0 \times 10^{-3}\%$

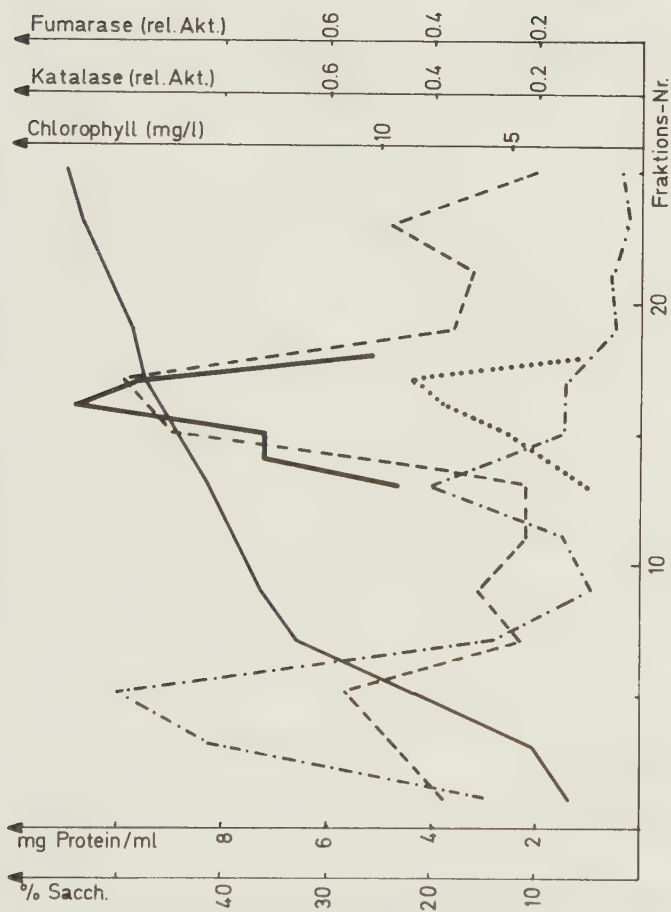
(Die Prozentangaben sind Umsatzraten in % der eingesetzten Radioaktivität.)

Umgerechnet auf die jeweils eingesetzten Proteinmengen ergaben sich daraus für die jeweiligen Inkubationsansätze folgende spezifische Aktivitäten für α -Benzylmalat-Synthase:

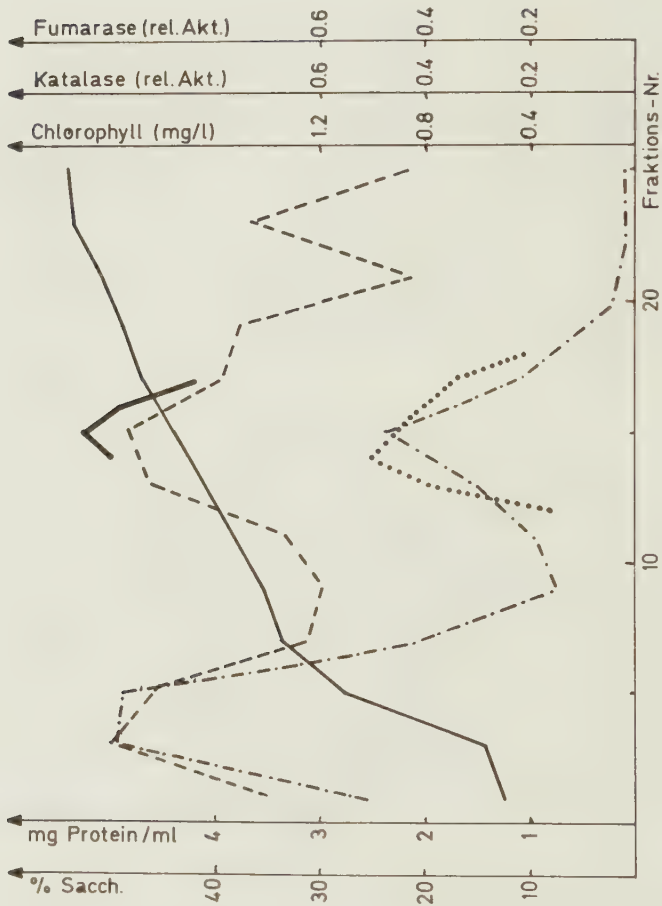
3.000xg-Fr.:	2×10^{-9} U/mg
15.000xg-Fr.:	2×10^{-9} U/mg
150.000xg-Fr.:	$12,8 \times 10^{-9}$ U/mg
Überstand	: $30,4 \times 10^{-9}$ U/mg

Bei den zur genaueren Charakterisierung der Organellenzusammensetzung auf einen kontinuierlichen Saccharosegradienten (25 - 55 %) aufgetragenen Fraktionen (15.000xg- und 150.000xg-Niederschlag) wurden über den gesamten Gradienten (1,5 ml-Fraktionen) eine Katalase- und Fumarasebestimmung durchgeführt. Chlorophyll- und Proteingehalt wurden nur in den stark grünen Fraktionen bestimmt. Die Ergebnisse der Bestimmungen sind in den folgenden graphischen Darstellungen wiedergegeben:

4 a



4 b



Graphische Darstellung 4 a, 4 b:

Auftrennung eines 15.000xg-Niederschlags (4 a) und eines 150.000xg-Niederschlags (4 b) über einen linearen Saccharosegradienten (25 - 55 %).

-.-.-.- Fumarase, - - - - Katalase
 Chlorophyll, **—** Protein,

_____ Saccharosegradient.

Die Auftrennung des 15.000xg- und des 150.000xg-Niederschlags über einen linearen Saccharosegradienten (25-55 %) zeigte, daß der 15.000xg-Niederschlag die Hauptmenge der Chloroplastenmembranen (Katalase-Maximum, etwa Faktor 10 größer gegenüber 150.000xg), sowie der Mitochondrien (Fumarase-Peak bei 42 % Saccharose) und den Hauptanteil der Blattperoxisomen (Katalase-Peak bei 54 % Saccharose) enthält. Die hohen Enzymaktivitäten im Überstand (Fraktion 1-7) sind vermutlich auf eine Zerstörung von Zellorganellen bei der Zentrifugation zurückzuführen. Der 150.000xg Niederschlag enthält noch Verunreinigungen von Chloroplastenmembran- und Peroxisomenmembran-Bruchstücken, jedoch ist die Katalaseaktivität um den Faktor 10 geringer. Auch scheinen noch Mitochondrien im 150.000xg- Niederschlag enthalten zu sein, worauf das Fumarase-Maximum bei 42 % Saccharose hinweist, jedoch sind auch hier die Enzymaktivitäten um den Faktor 10 geringer.

Insgesamt zeigt die Auftrennung, daß die Hauptmenge der schweren Membranen bei 15.000xg sedimentiert werden konnte. Die Verunreinigungen im 150.000xg-Niederschlag durch schwere Membranen kann jedoch die stark erhöhte α -Benzylmalat-Synthaseaktivität in dieser Fraktion nicht erklären, so daß ein weiterer Hinweis auf die Lokalisierung der Synthase in der microsomalen Membranfraktion gegeben ist.

In Abänderung der vorangegangenen Versuche wurde anstelle der bisher verwendeten Differentialzentrifugationsmethode die Auftrennung der Membranen über einen Saccharose-Stufengradienten (B 2.5.1) gewählt, der im folgenden Bild schematisch dargestellt ist:

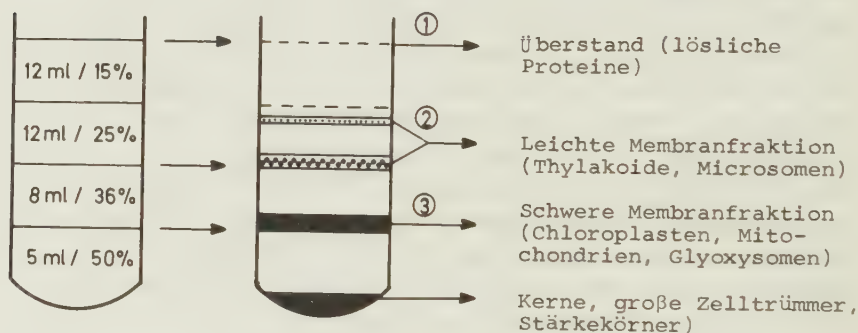


Abbildung 2:

Schematische Darstellung eines Saccharosestufengradienten und der aufgetrennten Membranfraktionen.

Die Fraktionen ①, ② und ③ wurden mit je 100 μCi L-Phenylalanin-4- $^3\text{H}^*$ und L-Aminosäureoxidase (B 2.5.1) inkubiert. Um zu belegen, daß das direkte Substrat der α -Benzylmalat-Synthase Phenylpyruvat und nicht Phenylalanin ist, wurde ein weiterer identischer Gradient, wie oben angegeben, fraktioniert, jedoch bei der Inkubation L-Aminosäureoxidase (LAOD) weggelassen. Bei der papierchromatographischen Reinigung zeigten sich im Gegensatz zu den Chromatogrammen der Fraktionen, die mit LAOD inkubiert wurden, keinerlei Peaks über das gesamte Chromatogramm. Lediglich am Start war eine geringe Phenylalaninaktivität zurückgeblieben. Ein Teststreifen jedes Chromatogrammes der Inkubationen

* (spez. Akt. 12 Ci/mMol)

ohne LAOD wurde in vierzehn Fraktionen aufgeteilt und im Szintillationszähler (B 4.5) ausgewertet. Es konnte keine signifikante Aktivität über das gesamte Chromatogramm nachgewiesen werden. Das stimmt mit dem Befund überein, daß 95 - 98 % der eingesetzten Radioaktivität (vermutlich Phenylalanin) beim Ausäthern der Fraktionen in der wäßrigen Phase zurückblieb und mit dem Rest am Start der Chromatogramme wieder etwa 100 % der eingesetzten Aktivität ergab. Es kann daraus geschlossen werden, daß Phenylpyruvat der direkte Vorläufer des α -Benzylmalats ist und weiterhin, daß die Aktivität einer Transaminase, die in vitro für die Umsetzung des Phenylalanins zu Phenylpyruvat verantwortlich sein dürfte, in den Inkubationsansätzen für den Nachweis einer Reaktion zu klein ist.

Die Ätherextrakte der mit LAOD inkubierten Fraktionen wurden ebenfalls papierchromatographisch (B 4.1, A, B) aufgetrennt und die Eluate der Benzylmalatzonen als Silylderivat gaschromatographisch fraktioniert und die Radioaktivität unter dem Benzylmalatpeak in Methanol angereichert.

Es ergaben sich für die einzelnen Fraktionen folgende Gesamtaktivitäten unter dem Benzylmalatpeak:

Überstand:	$4,6 \times 10^5$ dpm
Leichte Membranen:	$2,8 \times 10^5$ dpm
Schwere Membranen:	$2,4 \times 10^5$ dpm.

Bei der erneuten Rechromatographie der Silylderivate stellte sich heraus, daß die Aktivität, die sich nun unter dem Benzylmalatpeak befinden sollte, verschmiert war, wobei die Hauptaktivität wiederum unter dem Lösungsmittelpeak gefunden wurde. Eine weitere gaschromatographische Reinigung (Silylderivate) brachte das gleiche Ergebnis. Daraus ergibt sich die Vermutung, daß die Tritium-Markierung in p-Stellung am aromatischen Ring mit Protonen des Lösungsmittels austauscht (siehe C 2.3). Grundsätzlich war jedoch festzustellen, daß unter dem Benzyläpfelsäurepeak der Überstandsfraction und mit Abstrichen in der leichten Membranfraction jeweils die höchsten Radioaktivitäten gemessen werden konnten, ein weiterer Hinweis darauf, daß α -Benzylmalat-Synthase ein lösliches oder nur sehr schwach an eine Membran assoziiertes Protein ist. Der Befund, daß auch jeweils in der leichten Membranfraction eine erhöhte α -Benzylmalat-

Synthaseaktivität feststellbar war, läßt die Vermutung zu, daß die Synthaseaktivität schwach an eine Membran der microsomalen Fraktion gebunden ist. Diese Vermutung konnte in den weiteren Untersuchungen erhärtet werden.

1.3.3 Nachweis einer α -Benzylmalat-Synthaseaktivität in Eluaten von einer Sephadex G-50-Säule

Da die vorausgegangenen Versuche Hinweise dafür gebracht hatten, daß die Aktivität der α -Benzylmalat-Synthase in der löslichen Fraktion oder in der leichten Membranfraktion zu suchen war, wurden die Zentrifugationsmethoden durch gel-chromatographische Trennverfahren ersetzt. Außerdem wurden Coenzym A und ATP im Inkubationsmedium weggelassen, da Literaturhinweise bei "condensing enzymes" aus Hefe ⁸⁾ auf einen inhibitorischen Effekt von Coenzym A deuteten und eine ATP-Abhängigkeit nicht berichtet wurde.

Für die gelchromatographische Trennung wurde ein Homogenat (B 2.2 a)) aus 10 g Blättern (N. officinale) ohne Vorzentrifugation auf eine Sephadex G-50-Säule (B 4.4) aufgetragen. Nach dem Totvolumen (Dextranblau) wurden drei Fraktionen (5 ml) aufgefangen und mit je 100 μ Ci L-Phenylalanin-4-³H (spez. Akt. 12 Ci/mMol) 30 min inkubiert (B 2.5.1). Nach der zweifachen papierchromatographischen Reinigung (B 4.1, A, B) wurden in den Eluaten der Benzyläpfelsäurezonen folgende Radioaktivitäten gemessen:

Fraktion 1 (Frontfraktion, ml 1 - 5) :	39.000 dpm
Fraktion 2 (ml 6 - 10) :	28.000 dpm
Fraktion 3 (ml 11 - 15) :	129.000 dpm.

Die gaschromatographische Untersuchung brachte wiederum ein Verschmieren der Radioaktivität. Um diese immer wiederkehrende Schwierigkeit zu umgehen, wurde die gaschromatographische Identifizierung durch Umkristallisieren bis zur konstanten spezifischen Aktivität ersetzt.

Bei Fraktion 1 war nach 3-maligem Umkristallisieren die Aktivität auf 5,1 dpm/mg, entsprechend einer Gesamtaktivität von ca. 130 dpm, abgesunken.

Bei Fraktion 2 ergab sich nach 5-maligem Umkristallisieren eine konstante Aktivität von 21,5 dpm/mg (dreimal konstanter Wert); das entsprach einer Gesamtaktivität von 1.600 dpm. In Fraktion 3 wurde die Aktivität nach 6-maligem Umkristallisieren (viermal konstanter Wert) zu 56,3 dpm/mg bestimmt. Die Gesamtaktivität betrug 4.225 dpm.

Diese Ergebnisse stehen in guter Übereinstimmung mit den bisherigen Befunden, die eine Lokalisierung des Aktivitätsmaximums der α -Benzylmalat-Synthase in der löslichen Proteinfraction ergeben hatten.

Beim Umkristallisieren zur konstanten spezifischen Aktivität hatte sich gezeigt, daß auch bei den konstanten Werten aus der Umkristallisation eine, wenn auch sehr geringe ($> 3\%$), Abnahme der spezifischen Aktivität zu verzeichnen war, die nicht mit Meßfehlern bei der Probeneinwaage und bei der Bestimmung der Radioaktivität zu erklären ist. Es muß vielmehr angenommen werden, daß trotz der geringen Acidität des Lösungsmittelgemisches (Essigester/Petroläther) ein geringfügiger Austausch des ^3H am C-4 des aromatischen Ringes mit dem Lösungsmittelgemisch stattgefunden hat.

Um diese Fehlerquelle auszuschalten, wurde in den weiteren Versuchen zur Charakterisierung der α -Benzylmalat-Synthase L-Phenylalanin- $\text{U-}^{14}\text{C}$ anstelle von L-Phenylalanin- $4\text{-}^3\text{H}$ verwendet.

1.4 Nachweis des Einbaus von L-Phenylalanin- $\text{U-}^{14}\text{C}$ in Benzylmalat in vitro

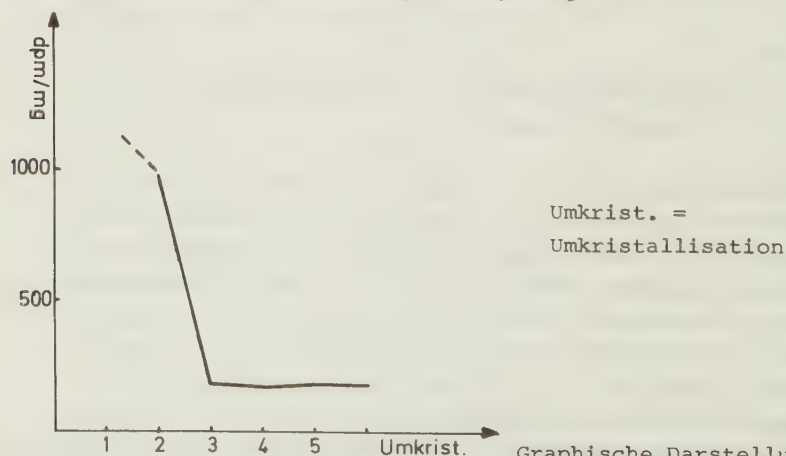
Die vorausgegangenen Versuche hatten zum einen gezeigt, daß aufgrund der Labilität der Markierung des L-Phenylalanins- $4\text{-}^3\text{H}$ Schwierigkeiten bei der Identifizierung des Benzylmalats auftraten. Es lag daher nahe, das ^3H -markierte Ausgangssubstrat der Biosynthesesequenz durch eine ^{14}C -markierte Ausgangsverbindung, L-Phenylalanin- $\text{U-}^{14}\text{C}$, zu ersetzen.

Zum anderen hatte das Elutionsverhalten der α -Benzylmalat-Synthase bei Sephadex G-50-Trennungen grobe Hinweise auf das Molekulargewicht des Enzyms gegeben, die durch weitere Trennungen über Sephadex G-50 und G-100 konkretisiert werden konnten.

1.4.1 Bestimmung des Molekulargewichts von α -Benzylmalat-Synthase über Sephadex G-50

Die in C 1.3.3 geschilderten Ergebnisse hatten aufgrund des Elutionsverhaltens der α -Benzylmalat-Synthase (5 - 15 ml nach dem Totvolumen) gezeigt, daß es sich, berücksichtigt man die Bedingungen des angewendeten Homogenisationsverfahrens, um ein lösliches oder schwach gebundenes Protein mit relativ geringem Molekulargewicht handeln mußte. Deshalb wurde nach dem Homogenisieren des Blattmaterials (B 2.2 a)) zunächst eine Zentrifugation bei 26.000xg durchgeführt und der Überstand (10 ml) auf eine Sephadex G-50-Säule (B 4.5 a)) aufgetragen. Da das Maximum der Enzymaktivität nach den vorangegangenen Untersuchungen zwischen 7 und 12 ml nach dem Totvolumen zu erwarten war, wurde diese Fraktion mit 100 μ Ci L-Phenylalanin-U- 14 C (spez. Akt. 10 mCi/mMol) 30 min inkubiert (B 2.5.2). Der Ätherextrakt wurde anschließend papierchromatographisch getrennt und rechromatographiert (B 4.1, A, B). Das Methanoleluat der Benzylmalatzzone enthielt $6,5 \times 10^5$ dpm.

Das Eluat wurde nach dem Einengen mit 200 mg α -Benzyläpfelsäure versetzt und fünfmal aus Essigester/Petroläther (B 4.5) umkristallisiert. Die nach den einzelnen Umkristallisationsschritten gemessenen spezifischen Aktivitäten (dpm/mg) sind in der graphischen Darstellung 5 aufgetragen:



Graphische Darstellung 5:

Umkristallisation der Benzylmalataktivität aus der Inkubation eines Sephadex G-50-Eluats mit L-Phenylalanin-U- 14 C.

Radioaktivitätsverlauf beim Umkristallisieren.

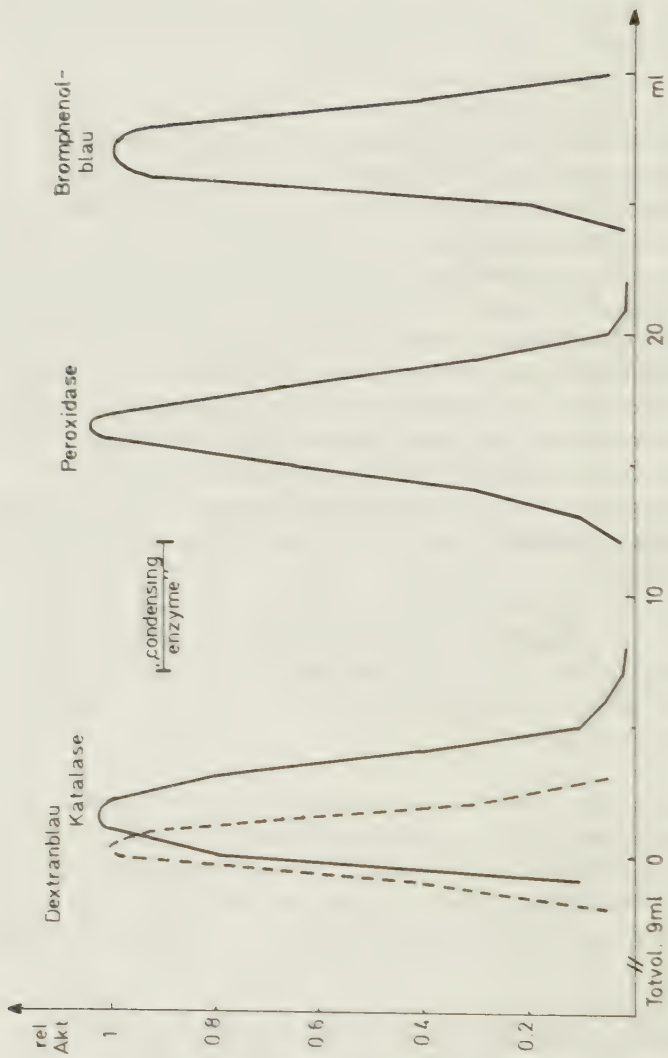
Aus den konstanten Werten bei der Umkristallisation ergab sich eine spezifische Aktivität von 182 dpm/mg. Die Gesamtaktivität betrug 36.400 dpm. Das entspricht, bezogen auf die eingesetzte Gesamtaktivität, einem Einbau von L-Phenylalanin-U- ^{14}C in Benzylmalat von $1,64 \times 10^{-2}\%$. Der Umsatz errechnet sich daraus zu 328 pMol/h.

Zur Kontrolle, daß die aus der Inkubation isolierte Benzyläpfelsäure tatsächlich einer enzymatischen Aktivität in der inkubierten Fraktion zuzuschreiben war, wurde ein Testansatz mit den gleichen Substraten und Hilfsenzymen (LAOD, PTA), jedoch ohne Zugabe des oben verwendeten Säuleneluats, unter identischen Bedingungen inkubiert. Nach der zweifachen papierchromatographischen Reinigung des Ätherextrakts der Inkubation (B 4.1, A, B) wurde ein Teststreifen der zweiten chromatographischen Trennung in fünfzehn Fraktionen aufgeteilt und im Flüssigkeitsszintillationszähler ausgewertet. Es konnte keine signifikante Aktivität im Bereich des Benzylmalats festgestellt werden, so daß die Bestätigung gegeben ist, daß das oben nachgewiesene Benzylmalat einer α -Benzylmalat-Syntheseaktivität zugeordnet werden muß.

Um den Bereich, in dem das Molekulargewicht der α -Benzylmalat-Synthase liegen sollte, weiter einzuengen, wurde die Sephadex G-50-Säule mit mehreren Molekulargewichtsmarkern und Proteinen grob kalibriert (B 4.4 a)).

Die in der graphischen Darstellung 6 aufgetragenen Enzymaktivitäten sind Relativwerte (Aktivitätsmaximum = 1). Die relativ große Breite der Peaks erklärt sich dadurch, daß analog der oben geschilderten Proteintrennung ebenfalls große Volumina eingesetzt wurden, um gleiche Ausgangsbedingungen zu schaffen.

In der graphischen Darstellung 6 ist das Elutionsverhalten der Proteine und Molekulargewichtsmarker bei der groben Kalibrierung der Sephadex G-50-Säule aufgezeichnet:



Graphische Darstellung 6:

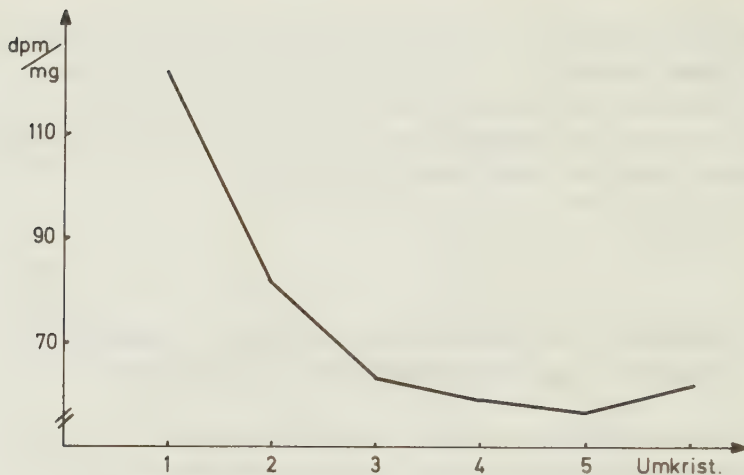
Fällfrierung einer Sephadex G-50-Säule.

(Es wurden relative Enzymaktivitäten gegen das Elutionsvolumen in ml aufgetragen).

Aus dem Elutionsverhalten der α -Benzylmalat-Synthasefraktion bei dem oben geschilderten Inkubationsversuch kann im Vergleich zum Elutionsverhalten der Markersubstanzen auf ein Molekulargewicht der Synthase zwischen 40.000 und 80.000 Dalton geschlossen werden. Diese Eingrenzung konnte in weiteren Versuchen bestätigt werden.

1.4.2 Nachweis von α -Benzylmalat-Synthase in Ammoniumsulfatfällungen von Zentrifugationsüberständen

Um durch Aufarbeitung größerer Blattmengen größere Proteinmengen bei kleineren Volumina für gelchromatographische Trennungen zu erhalten, wurde die Stabilität der α -Benzylmalat-Synthase gegenüber einer Ammoniumsulfat-Totalfällung untersucht. Dazu wurde, wie in B 2.5.2 beschrieben, der 39.000xg-Überstand eines Rohextrakts aus 40 g Blättern einer Ammoniumsulfatfällung bis zu 80%iger Sättigung unterworfen (B 4.4 c)). Der sedimentierte Niederschlag wurde in Puffer aufgenommen und über eine Sephadex G-50-Säule (B 4.4 c)) aufgetrennt. Analog C 1.4.1 wurde die Fraktion zwischen 7 und 12 ml nach dem Totvolumen mit 50 μ Ci L-Phenylalanin- $U^{14}C$ (spez. Akt. 10 mCi/mMol) 30 min inkubiert (B 2.5.2). Das Eluat der Benzylmalatzone nach der zweiten papierchromatographischen Reinigung (B 4.1, A, B) enthielt 60.000 dpm. Nach Zugabe von 201,6 mg α -Benzyläpfelsäure als Träger wurde sechsmal umkristallisiert. Die spezifische Aktivität der einzelnen Kristallisate ist in der graphischen Darstellung 7 aufgetragen.



Graphische Darstellung 7:

Umkristallisation einer α -Benzylmalataktivität
(siehe dazu Text C 1.4.2).

Aus den konstanten Werten bei der Umkristallisation ergab sich eine spezifische Aktivität von 60,5 dpm/mg entsprechend einer Gesamtaktivität von 12.200 dpm.

Das entspricht einer Einbaurrate von L-Phenylalanin- $U-^{14}C$ in Benzylmalat von $1,1 \times 10^{-2}\%$, der Umsatz berechnet sich daraus zu 110 pMol/h. Bei einer Proteinkonzentration von 10 mg/ml in der Inkubation (5 ml) ergibt sich für α -Benzylmalat-Synthase eine spezifische Aktivität von 2,2 pMol/h/mg Protein.

Zur Kontrolle wurde die Radioaktivität in 10,12 mg inaktiver α -Benzyläpfelsäure bestimmt. Es ergab sich eine Gesamtaktivität von 7,4 dpm $\hat{=}$ 0,73 dpm/mg. Die gemessenen Werte für die Bildung von Benzylmalat können also ohne Korrektur als Realwerte angesehen werden.

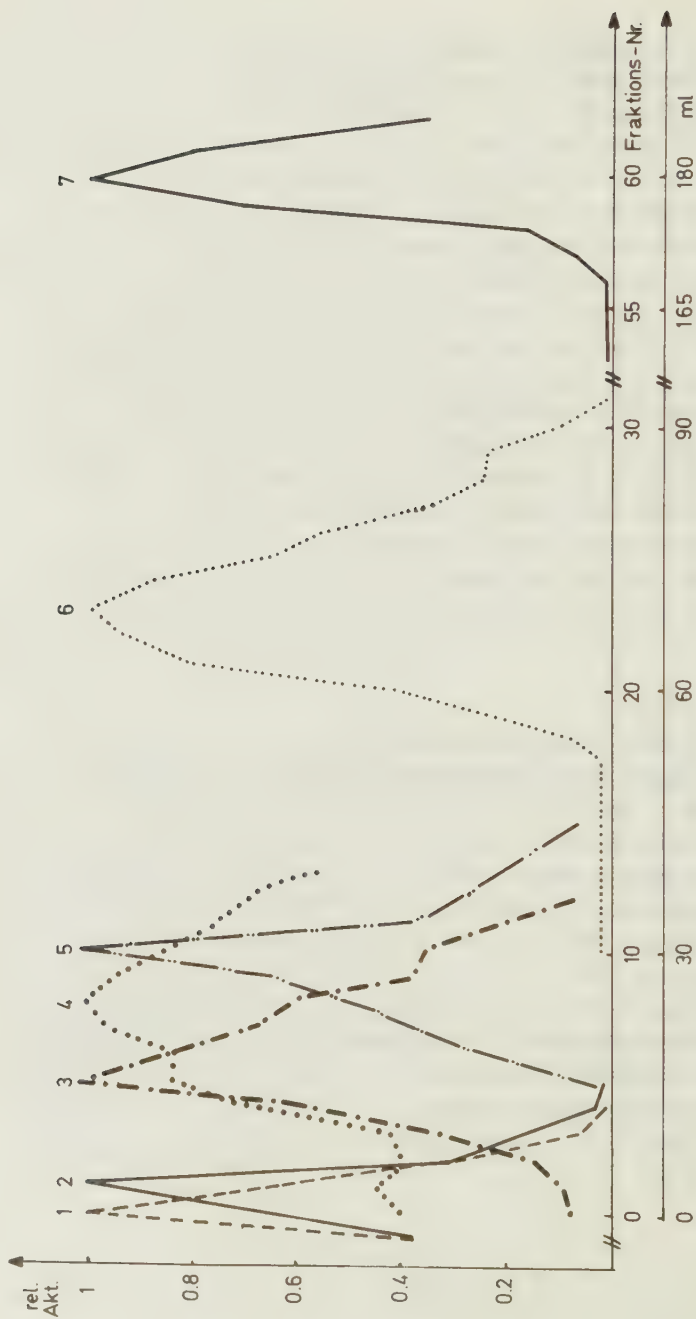
Aus einem Vergleich der Versuche C 1.4.1 und C 1.4.2 können Schlüsse über die Stabilität der α -Benzylmalat-Synthase gegen Ammoniumsulfat gezogen werden:

In beiden Versuchen betrugen die Proteinkonzentrationen im 39.000xg-Überstand 10 mg/ml. Im ersten Versuch wurden 10 ml Überstand ohne Fällung über Sephadex G-50 aufgetrennt, im zweiten Versuch wurden 40 ml Überstand einer Ammoniumsulfatfällung unterworfen und über Sephadex G-50 fraktioniert. Das Verhältnis der Gesamtproteinmengen betrug also 1 : 4, bei den Radioaktivitätsmengen war das Verhältnis 2 : 1. Alle weiteren Bedingungen waren identisch. Die Gesamtausbeuten für α -Benzylmalat sollten danach also im Verhältnis 1 : 2 stehen. Gefunden wurde jedoch ein Verhältnis von 3 : 1 (36.400 dpm : 12.200 dpm). Daraus ergibt sich die Konsequenz, daß die Ammoniumsulfatfällung der α -Benzylmalat-Synthase mit einem hohen Aktivitätsverlust (80 %) verbunden ist und damit als Anreicherungsverfahren oder Reinigungsschritt ausscheidet.

1.4.3 Bestimmung des Molekulargewichts von α -Benzylmalat-Synthase über eine kalibrierte Sephadex G-100-Säule

Um eine bessere Auftrennung und damit genauere Molekulargewichtsbestimmung der α -Benzylmalat-Synthase zu ermöglichen, wurde eine Sephadex G-100-Säule (B 4.5 b)) zunächst mit mehreren Proteinen und Molekulargewichtsmarkern kalibriert (B 4.4).

In Darstellung 8 ist das Elutionsverhalten der Proteine und Molekulargewichtsmarker aufgezeichnet. Die aufgetragenen Enzymaktivitäten sind Relativwerte, wobei das Aktivitätsmaximum jeweils gleich 1 gesetzt wurde.



Graphische Darstellung 8:

Legende siehe S. 59

Legende zur graphischen Darstellung 8:

Elutionsdiagramm bei der Kalibrierung der Sephadex G-100-Säule mit verschiedenen Markern.

Erläuterungen der verwendeten Symbole:

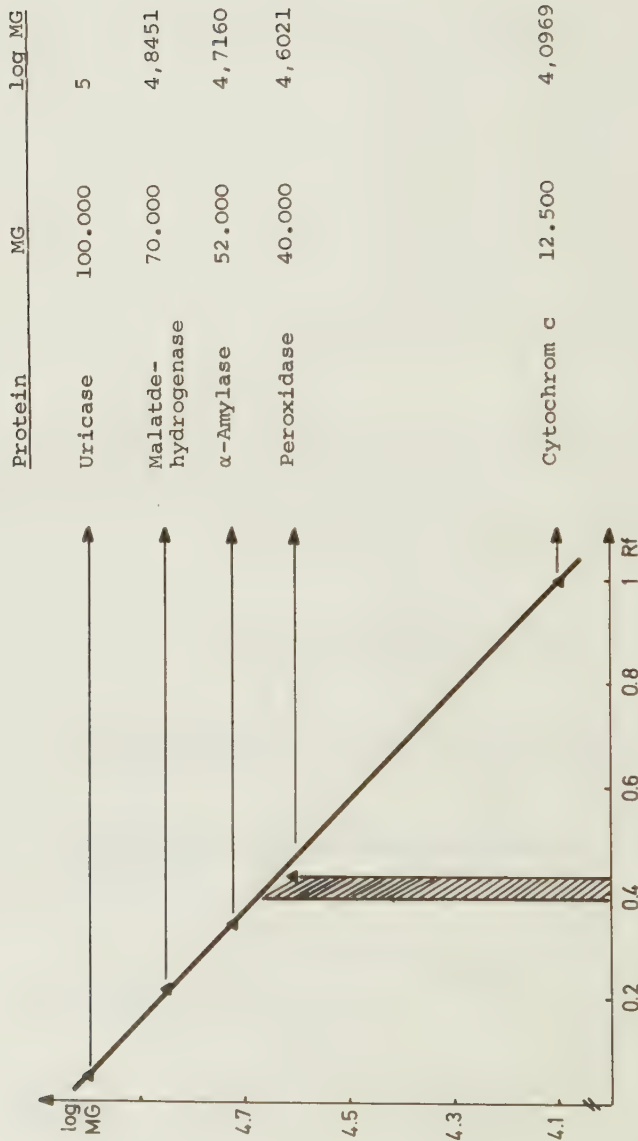
- 1 = Dextranblau -----
2 = Uricase _____
3 = Malatdehydrogenase -----
4 = α -Amylase • • • • •
5 = Peroxidase -••-••-••-••-
6 = Cytochrom c
7 = Bromphenolblau _____
-

Um aus dem Elutionsverhalten der α -Benzylmalat-Synthase auf das Molekulargewicht schließen zu können, wurde der Logarithmus des Molekulargewichts der Testproteine gegen ihren Rf-Wert aufgetragen, wobei der Rf-Wert nach der Formel

$$R_f = \frac{\text{Elutionsvolumen}}{\text{Bettvolumen} - \text{Totvolumen}}$$

berechnet wurde. Cytochrom c wurde als Standard angenommen und sein Rf-Wert = 1 gesetzt.

In der folgenden Graphik ist diese Auftragung dargestellt:



Graphische Darstellung 9:

Eichkurve zur Molekulargewichtsbestimmung von α-Benzylmalat-Synthase.

(Der schraffierte Bereich entspricht dem Rf der α-Benzylmalat-Synthase.)

Zur exakteren Bestimmung des Molekulargewichts der α -Benzylmalat-Synthase, der nach der Sephadex G-50-Fraktionierung ein Molekulargewicht von 40.000 - 80.000 Dalton zugeordnet werden konnte, wurde die Hälfte der Fraktionen (siehe graphische Darstellung 8) 3 - 5 (6 - 15 ml), 6 - 8 (18 - 24 ml) und 9 - 11 (27 - 33 ml) mit je 50 μ Ci Phenylalanin-U- 14 C (spez. Akt. 10 mCi/mMol) 30 min inkubiert. Parallel dazu wurde die Hälfte der Fraktionen 1 - 5 (1 - 15 ml), 6 - 10 (16 - 30 ml) und 11 - 15 (31 - 45 ml) mit je 10 μ Ci β -Benzyläpfelsäure-1,2- 14 C (spez. Akt. 268 μ Ci/mMol) ebenfalls 30 min inkubiert (B 2.5.2).

Ausgangsmaterial waren 10 g Blätter, die homogenisiert und anschließend einer Zentrifugation bei 39.000xg unterworfen wurden. Der Überstand wurde auf eine kalibrierte Sephadex G-100-Säule aufgetragen und, wie oben geschildert, fraktioniert und inkubiert. Die Ätherextrakte aller Inkubationen wurden papierchromatographisch zweifach gereinigt (B 4.1, A, B).

Bei den Fraktionen 1 - 15, die auf die Bildung von 2-Keto-4-phenylbuttersäure hin untersucht wurden, ergab sich bei der Rechromatographie keine erhöhte Aktivität im Bereich der gesuchten Substanz. Die Untersuchung der jeweiligen Teststreifen, die in 15 Fraktionen aufgeteilt waren, ergab bei der Auswertung im Flüssigkeitsszintillationszähler keine signifikante Aktivität im Bereich der 2-Keto-4-phenylbuttersäure. Die Aktivität fand sich ausschließlich im Bereich des eingesetzten β -Benzylmalats wieder, so daß die Bildung der Keto-Säure in meßbaren Größenordnungen in diesem System als ausgeschlossen angesehen werden kann.

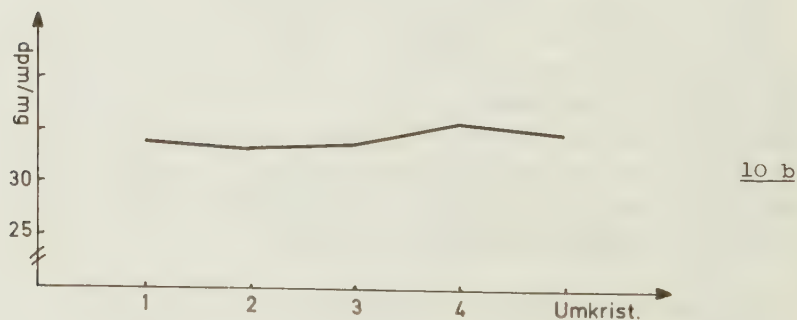
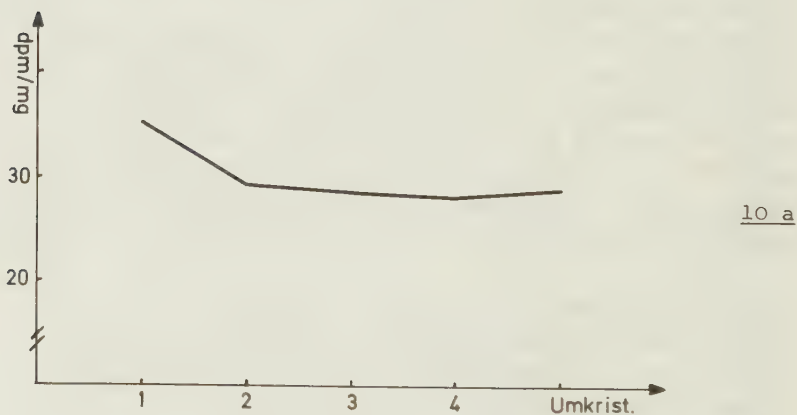
Die Eluate der Benzylmalatzonen nach der zweiten Papierchromatographie ergaben folgende Werte für die Radioaktivität:

Inkubation 1	(Fr. 3 - 5) :	1.800 dpm
Inkubation 2	(Fr. 6 - 8) :	20.500 dpm
Inkubation 3	(Fr. 9 -11) :	27.600 dpm

Die Eluate wurden mit 207, 202 und 210 mg α -Benzyl-äpfelsäure als Träger versetzt und umkristallisiert (B 4.5).

Für Inkubation 1 lag die spezifische Aktivität bereits nach dem 1. Umkristallisieren unter 5 dpm/mg, so daß von einer weiteren Bearbeitung dieser Probe abgesehen wurde.

Die spezifischen Aktivitäten, die bei den einzelnen Umkristallisationen der Inkubationen 2 und 3 gemessen wurden, sind in den folgenden graphischen Darstellungen wiedergegeben:



Graphische Darstellung 10 a, 10 b:

Umkristallisation des Benzylmalats aus Inkubation 2 (10 a) und 3 (10 b) zur konstanten spezifischen Aktivität.

Aus den konstanten Werten bei der Umkristallisation ergab sich für das Benzylmalat aus Inkubation 2 eine spezifische Aktivität von 27 dpm/mg, für Inkubation 3 wurden 38 dpm/mg gemessen.

Daraus errechnet sich für:

Inkubation 2 (Fr. 6 - 8) eine Gesamtaktivität von 5.450 dpm,
Inkubation 3 (Fr. 9 -11) eine Gesamtaktivität von 8.140 dpm.

Die Einbaurate von L-Phenylalanin-U-¹⁴C in Benzylmalat beträgt danach für:

Inkubation 2 : $5,0 \times 10^{-3}\%$
Inkubation 3 : $7,3 \times 10^{-3}\%$.

Das entspricht Umsätzen von
90 pMol/h bzw.
146 pMol/h.

Nimmt man das Maximum der α -Benzylmalat-Synthaseaktivität im Bereich der getesteten Fraktionen (6 - 11) an, so ergibt sich nach Bestimmung auf einer kalibrierten Säule ein Wert zwischen 40.000 und 50.000 Dalton für das Molekulargewicht der α -Benzylmalat-Synthase.

Zur weiteren Absicherung dieses Befundes wurden 30 g Blätter homogenisiert und der Überstand der 39.000xg-Zentrifugation einer Ammoniumsulfatfällung (B 4.4) unterworfen. Das Sediment der 26.000xg-Zentrifugation wurde in 2 ml Puffer gelöst und auf die kalibrierte Sephadex G-100-Säule (C 1.4.3) aufgetragen. Fraktion 10 und 11 (27 - 33 ml) wurden 30 min mit je 30 μ Ci L-Phenylalanin-U-¹⁴C (spez. Akt. 10 mCi/mMol) inkubiert (B 2.5.2). Nach einer zweifachen papierchromatographischen Reinigung (B 4.1, A, B) ergab sich für Fraktion 10 eine Gesamtradioaktivität von 18.000 dpm, Fraktion 11 wurde zu 40.000 dpm bestimmt.

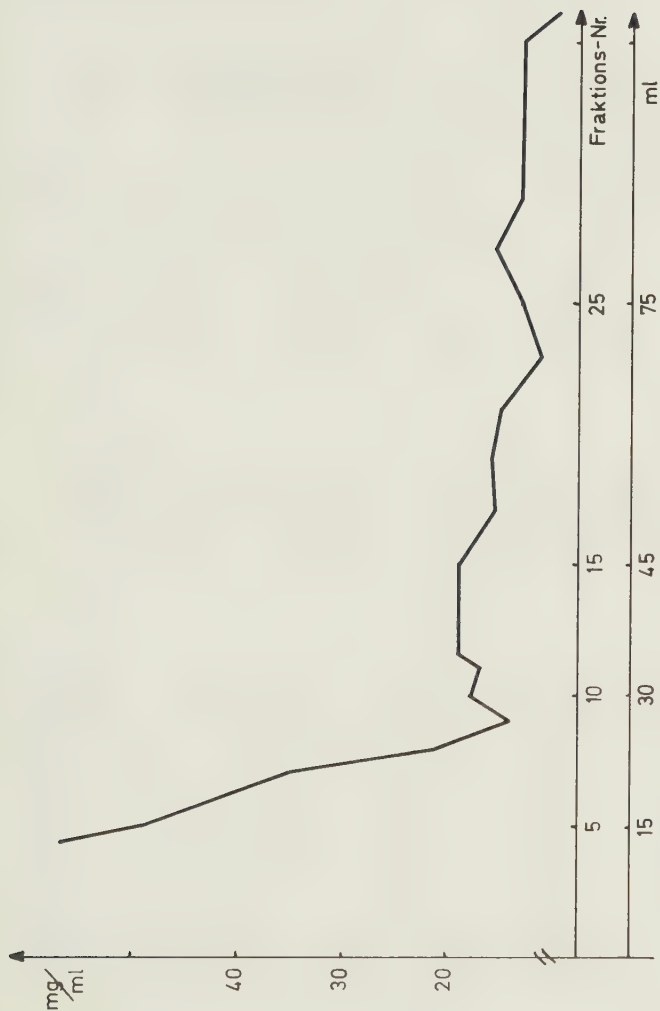
Nach Zugabe von 100 mg α -Benzylmalat wurde zur konstanten spezifischen Aktivität umkristallisiert.

Für Fraktion 10 ergaben sich bei 4-maligem Umkristallisieren Werte zwischen 21,8 und 21,1 dpm/mg, das entspricht einer Gesamtaktivität von 4.200 dpm.

Für Fraktion 11 konnten keine konstanten Werte erhalten werden, so daß eine Aussage unmöglich erscheint. Die Höhe der in Fraktion 10 gefundenen Aktivität entspricht aufgrund des Aktivitätsverlustes bei der Ammoniumsulfatfällung und der eingesetzten geringeren Aktivitätsmenge dem zu erwartenden Wert.

Dieses Versuchsergebnis läßt keine Schlüsse über eine weitere Eingrenzung des Molekulargewichts der α -Benzylmalat-Synthase zu. Es konnte lediglich in Fraktion 10 Synthaseaktivität nachgewiesen werden, was den bisherigen Befunden entspricht.

In einem Kontrollversuch wurden 50 g Blätter aufgearbeitet und analog der im vorigen Abschnitt geschilderten Verfahrensweise weiter behandelt. Trotz des zu erwartenden Aktivitätsverlustes wurde eine Ammoniumsulfatfällung zur Ankonzentrierung des Überstandes (45 ml) durchgeführt. Der Ammoniumsulfatniederschlag wurde in 4 ml Puffer suspendiert und über eine kalibrierte Sephadex G-100-Säule (B 4.4) fraktioniert. In den Fraktionen 1 - 36 wurde eine Proteinbestimmung durchgeführt (B 4.6). Das Proteinprofil des Säuleneluats ist in Darstellung 11 aufgezeichnet:



Graphische Darstellung 11:

Proteinbestimmung in den Fraktionen eines Sephadex G-100-Eluats

Zur Bestätigung des ermittelten Molekulargewichts wurden die Fraktionen 8 - 12 mit je 30 μ Ci L-Phenylalanin-U- 14 C (spez. Akt. 10 mCi/mMol) 30 min inkubiert und die Ätherextrakte der Fraktion 2-fach papierchromatographisch gereinigt.

In den Eluaten der Benzylmalatzzone konnten nach der zweiten papierchromatographischen Trennung folgende Radioaktivitätsmengen bestimmt werden:

Fraktion	dpm
8	49.000
9	41.500
10	66.500
11	37.700
12	45.500

Nach 4-maligem Umkristallisieren mit je 100 mg α -Benzyl-äpfelsäure (es wurden bei allen Fraktionen dreimal konstante spezifische Aktivitäten erhalten) ergaben sich die in der nachstehenden Tabelle aufgelisteten Werte:

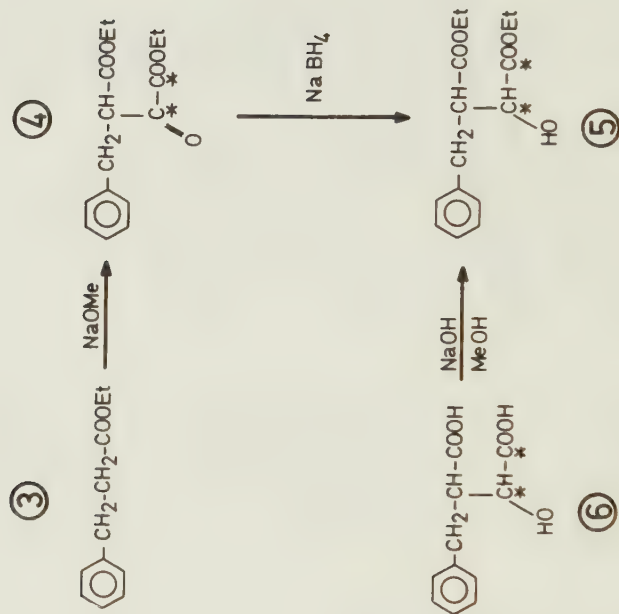
Fr.	dpm/mg	dpm (gesamt)	Umsatz (pMol/h)	Einbaurate ($10^{-3}\%$)	spez.Akt. (pMol/h/mg Prot
8	4,7	952	8,4	1,4	0,4
9	17,8	3.676	33,0	5,5	2,4
10	19,2	3.959	36,0	6,0	2,0
11	6,2	1.324	12,0	2,0	0,7
12	7,3	1.526	13,8	2,3	0,72

Tabelle 10

Das Aktivitätsmaximum liegt danach bei Fraktion 9 und 10. Korreliert man dieses Elutionsverhalten der α -Benzylmalat-Synthase mit der in C 1.4.3 geschilderten Kalibrierung der Sephadex G-100-Säule, so ergeben sich für die beiden Fraktionen Rf-Werte von 0,39 bzw. 0,435. Das entspricht nach der Eichkurve (graphische Darstellung 9) einem Molekulargewicht der α -Benzylmalat-Synthase von 44.000 - 48.000 Dalton. Berücksichtigt man, daß aufgrund der zu erwartenden geringen Umsätze sehr große Proteinmengen auf die Säule aufgetragen werden mußten, und somit keine optimale Trennung der Proteine erreicht werden konnte, was sich auch aus den Ergebnissen der obenstehenden Tabelle ablesen läßt, so erscheint es gerechtfertigt, die Aussage über das Molekulargewicht auf einen Wert zwischen 40.000 und 50.000 Dalton festzulegen.

2. Radiochemische Synthesen

2.1 Synthese von β -Benzyläpfelsäure-1,2- ^{14}C



- 1 = Oxalsäure- ^{14}C
- 2 = Oxalsäurediäthylester- ^{14}C
- 3 = Phenylpropionsäurediäthylester
- 4 = 2-Keto-3-benzylbernsteinsäurediäthylester-1,2- ^{14}C
- 5 = β -Benzyläpfelsäurediäthylester-1,2- ^{14}C
- 6 = β -Benzyläpfelsäure-1,2- ^{14}C

Schema 5:

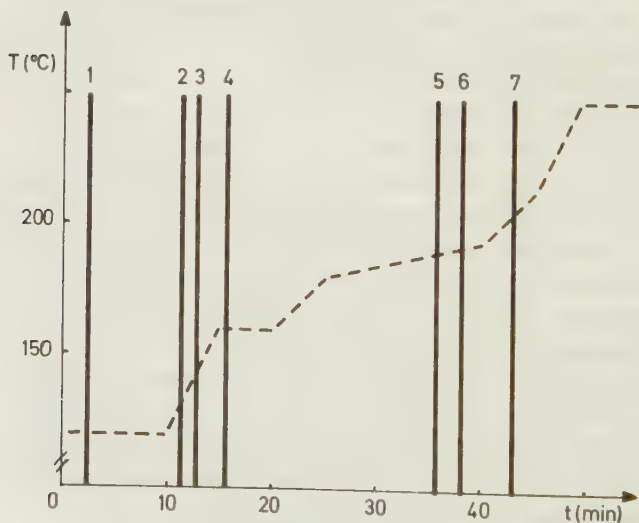
Darstellung der Reaktionsfolge bei der radiochemischen Synthese von β -Benzyläpfelsäure-1,2- ^{14}C .

Die Überführung der Oxalsäure- ^{14}C in den Diäthylester verlief problemlos mit ca. 95%iger Ausbeute. Schwierigkeiten nach diesem Reaktionsschritt bereitete jedoch die Abtrennung der p-Toluolsulfonsäure und die unabdingbare Trocknung des gebildeten Oxalsäurediäthylesters- ^{14}C im mMol-Maßstab. Nach ausgedehnten Versuchen erwies sich die destillative Abtrennung und Trocknung des Diäthylesters bei tiefen Temperaturen im Vacuum (B 3.1) als vorteilhaft gegenüber dünnschicht- und gaschromatographischen Trennverfahren. Mit Hilfe der in B 3.1 skizzierten Apparatur und der geschilderten Verfahrensweise gelang es, sowohl die quantitative Ausbeute als auch die Voraussetzungen für einen glatten Verlauf des nächsten Reaktionsschrittes zu optimieren. Bei der nun folgenden Kondensation des Oxalsäurediäthylesters- ^{14}C mit Phenylpropionsäureäthylester war das Arbeiten unter Wasserausschluß (trockene Reagenzien und Einschalten einer Gaswaschflasche mit P_2O_5 auf Glaswolle zwischen Rotavapor und Wasserstrahlpumpe) Grundbedingung für eine gute Ausbeute. Um das Gleichgewicht auf die Seite des Reaktionsproduktes zu verschieben, erwies es sich als günstig, den Phenylpropionsäureäthylester im leichten Überschuß (0,18 mMol) zuzusetzen und den bei der Reaktion gebildeten Alkohol durch Abrotieren (B 3.1) aus dem Gleichgewicht zu entfernen. Eine dünnschichtchromatographische Reinigung des 2-Keto-3-benzylbernsteinsäurediäthylesters-1,2- ^{14}C erbrachte keine Ausbeuteverbesserung im nächsten Reaktionsschritt. Um Ausbeuteverluste durch die Reinigung selbst (nicht vollständiges Eluieren vom Kieselgel, mehrfaches Umfüllen und Ausäthern) zu vermeiden, wurde das Reaktionsgemisch direkt in Wasser-Methanol (B 3.1) aufgenommen und 24 h mit NaBH_4 reduziert. Obwohl die Hauptmenge der eingesetzten Ketoverbindung bereits nach kurzer Zeit reduziert war, konnte anhand gaschromatographischer Tests nach verschiedenen Reaktionszeiten gezeigt werden, daß durch die verlängerte Reduktionsdauer die Ausbeute um 10 - 20 % heraufgesetzt werden konnte. Versuche, die Reduktion mit NaH in Xylol durchzuführen, führten zu geringeren Ausbeuten; dies ist vermutlich auf die weitaus schlechtere Löslichkeit

der Ausgangsverbindungen in dieser Lösung zurückzuführen. Die gaschromatographische Untersuchung des Ätherextraktes, der ca. 82 % der eingesetzten Radioaktivität enthielt, zeigte, daß etwa 70 % der Aktivität dem gewünschten Produkt entsprachen.

Die Hydrolyse des Diäthylesters zum Endprodukt stellte den hinsichtlich der Ausbeute unbefriedigendsten Schritt der Synthese dar. Versuche, durch Variation der Hydrolysezeit (5 - 36 h) oder durch Änderung der NaOH-Konzentration (2 - 7 N), die Ausbeute an freier Säure zu erhöhen, brachten nicht den gewünschten Erfolg. Längere Hydrolysezeiten (über 20 h) oder erhöhte NaOH-Konzentrationen (> 4 N) führten zu erhöhten Mengen an undefinierten Zersetzungsprodukten, kürzere Zeiten und wesentlich kleinere NaOH-Konzentrationen zum verstärkten Auftreten von (vermutlich) Monoester und weiteren nicht identifizierten Produkten.

In der Darstellung 12 ist die gaschromatographische Auftrennung von Ausgangs- und Zwischenprodukten sowie einigen Markern wiedergegeben:



Graphische Darstellung 12:

Gaschromatographische Identifizierung der Ausgangs-, Zwischen- und Endprodukte bei der Synthese von β -Benzyläpfelsäure-1,2- ^{14}C . Die nähere Bezeichnung der Peaks 1 - 7 wird auf der nächsten Seite gegeben.

Nähere Bezeichnung der Peaks 1 - 7 aus der graphischen
Darstellung 12:

1	=	Oxalsäurediäthylester
2	=	Phenylpropionsäureäthylester
3	=	2-Keto-3-benzylbernsteinsäurediäthylester
4	=	2-Keto-3-benzylbernsteinsäurediäthylester nach der Reduktion
5	=	Phenylpropionsäure
6	=	α -Benzyläpfelsäuredimethylester
7	=	β -Benzyläpfelsäuredimethylester.

2.2 Enzymatische Synthese von Acetyl-Coenzym A-2- ^{14}C

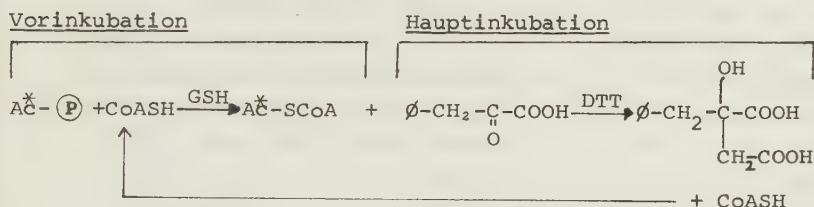
Grundsätzlich ist die Synthese von Acetyl-Coenzym A-2- ^{14}C auf zwei Wegen möglich. Die chemische Synthese von Simon und Shemin²⁸⁾ geht von Acetanhydrid-1- ^{14}C aus, das mit Coenzym A umgesetzt wird. Die Ausbeute beträgt bei dieser Synthese nach der papierchromatographischen Reinigung ca. 20 % des theoretischen Wertes. Nachteile der chemischen Synthese sind hohe Fremdsalzkonzentrationen bei der Bildung des Acetyl-Coenzym A-2- ^{14}C , die eine chromatographische Reinigung des Produkts nötig machen. Dabei ist mit Ausbeuteverlusten zu rechnen.

Die enzymatische Synthese, die aus einem photometrischen Test für Phosphotransacetylase (PTA)²¹⁾ entwickelt wurde, geht von Acetylphosphat-2- ^{14}C aus, das durch PTA auf Coenzym A übertragen wird.

Bei der Entwicklung der enzymatischen Synthesevorschrift wurden, ausgehend von der Testvorschrift, zunächst die molaren Mengen der eingesetzten Reagenzien und die Inkubationsdauer variiert, um eine Ausbeuteoptimierung zu erreichen. Die radiochemische Ausbeute wurde in den Vorversuchen papierchromatographisch und anschließend durch Papierscanning und zusätzlich photometrisch bestimmt. Die Gesamtausbeute an Acetyl-Coenzym A-2- ^{14}C lag bei den Versuchen zwischen 30 und 50 % des theoretischen Wertes. Die spezifische Aktivität des Acetyl-Coenzym A-2- ^{14}C wurde zu 625 $\mu\text{Ci}/\text{mMol}$ bestimmt.

Der Vorteil der enzymatischen Synthese bestand darin, daß einmal in einer Vorinkubation die gewünschte Menge Acetyl-Coenzym A-2- ^{14}C direkt bereitgestellt werden konnte, ohne große Mengen Fremdsalze und markiertes Acetat in die Hauptinkubation einzubringen. Zum anderen war es von Vorteil, daß auch in der Hauptinkubation ein Acetyl-Coenzym A regenerierendes System vorhanden war, das bei der Reaktion freigesetzte (möglicherweise inhibierende⁸⁾) Coenzym A bei einem Überschuß von Acetylphosphat-2- ^{14}C wieder in das Ausgangsprodukt der Reaktion umsetzen konnte.

Im folgenden Reaktionsschema ist die Gesamtreaktion dargestellt:



Schema 6

Reaktionsschema der bei der Inkubation mit Acetyl-Coenzym A ablaufenden Gesamtreaktion (Vorinkubation und Hauptinkubation).

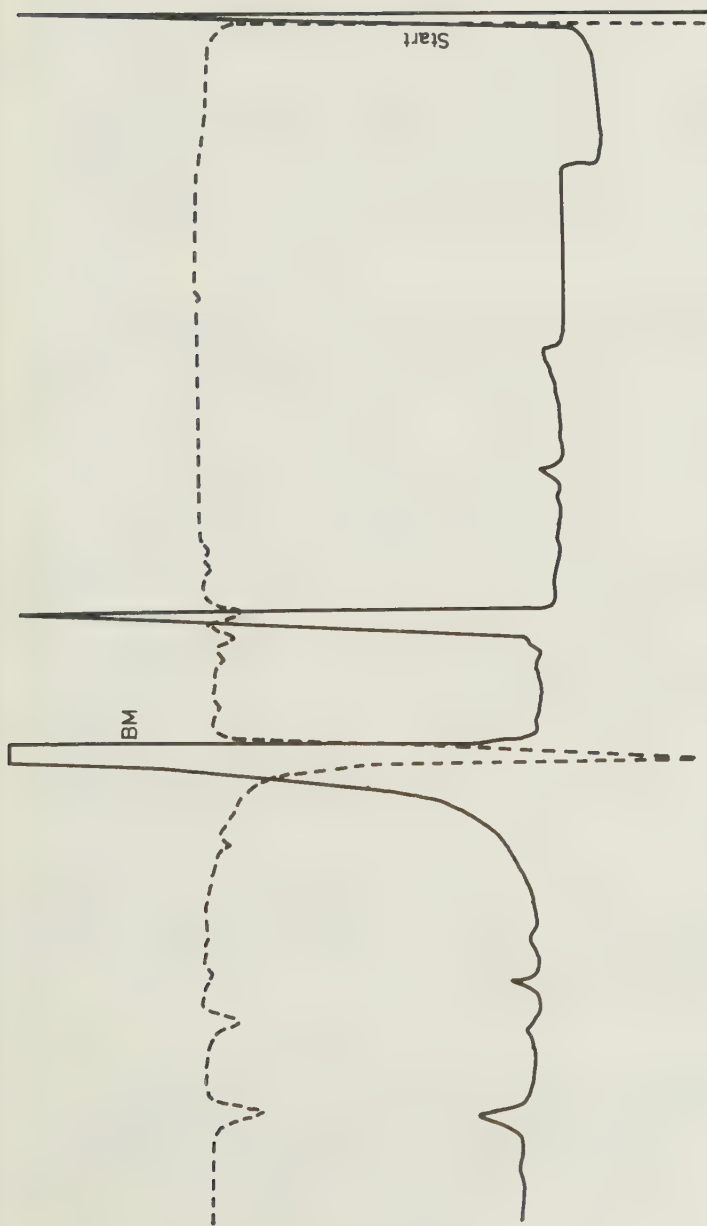
3. Auswertung der kombinierten GC-Massenspektren

Nach der papierchromatographischen Reinigung (B 4.1) der Reaktionsprodukte aus Inkubationen mit L-Phenylalanin-4-³H sollte die gaschromatographische Trennung der Benzyläpfelsäuren als Kriterium für die Reinheit dienen. Wie in B 4.3 bereits beschrieben, mußte wegen der geringen Aktivitäten unter dem Benzyläpfelsäurepeak auf eine Trennung der α- und β-Isomeren verzichtet werden und die Identifizierung der Mischung aus beiden Produkten (als Silylderivate) im Vordergrund stehen. Es zeigte sich jedoch, daß auch nach der gaschromatographischen Trennung und Anreicherung in Methanol bei der Rechromatographie der erneut silylierten Benzyläpfelsäurefraktion ein völlig reproduzierbares Spektrum von Nebenpeaks und im Verschmieren der Hauptmenge der Radioaktivität auftrat. Variieren von Dauer und Temperatur bei der Silylierung (30 min - 2 h, 80 - 140 °C) führte lediglich zu einer Verschiebung der Intensitäten der Nebenpeaks. Um die Identität der Nebenprodukte und das eventuell damit verbundene Ver-

schmieren der Radioaktivität zu klären, wurden kombinierte GC-Massenspektren aufgenommen (B 4.3). Dabei wurde auf die Anzeige aller Zerfallsprodukte der Nebenpeaks verzichtet und nur Peaks der Masse $M = 91$ (Tropylium-Kation), einem charakteristischen Bruchstück von Aromaten mit Alkylseitenkette, also auch der Benzyläpfelsäuren, registriert. Wenn die intensiven Nebenpeaks der Gaschromatogramme auch Fragmente mit der Masse $M = 91$ enthielten, wäre damit ein wesentlicher Hinweis für folgende Vermutung gegeben: Da die Radioaktivität dieser Nebenpeaks aus Zonen stammt, die bei der Papierchromatographie nur Dicarbonsäuren zugeschrieben werden können, ferner Benzylgruppen zugeordnet ist, bliebe nur die Möglichkeit, daß es sich um Artefakte aus Benzyläpfelsäure handelt.

Tatsächlich konnte gezeigt werden, daß die meisten Nebenpeaks eine Komponente der Masse 91 beinhalten; sie stellten jedoch nur insgesamt etwa 10 - 15 % der Intensität des Benzyläpfelsäurepeaks dar. Das Verschmieren der Hauptaktivitätsmenge konnte somit also nicht wesentlich mit einer Zersetzung der Benzyläpfelsäuren beim Silylieren erklärt werden. In einem Kontrollversuch wurde α -Benzyläpfelsäure-2- ^{14}C als Silylderivat gaschromatographisch gereinigt und rechromatographiert. Es zeigte sich zwar ein identisches Zersetzungsspektrum wie bei der tritiierten Verbindung, jedoch konnten ca. 80 % der Aktivität wieder unter dem Benzyläpfelsäurepeak aufgefangen werden. Das entspricht den Befunden der massenspektrometrischen Untersuchungen und gibt zu der Vermutung Anlaß, daß das Verschmieren der Radioaktivität aus den Inkubationen mit L-Phenylalanin-4- ^3H auf andere Reaktionen oder auf Fremdaktivität zurückzuführen ist. Unter anderen Reaktionen wäre ein Austausch des in der p-Stellung am aromatischen Ring aktivierten [^3H]-Substituenten mit Protonen aus dem Lösungsmittel denkbar. Unterstützt wird diese Hypothese durch sehr stark erhöhte Aktivitäten unter dem Lösungsmittelpeak bei der Gaschromatographie.

In der folgenden graphischen Darstellung ist ein kombiniertes GC-Massenspektrum (Substanzpeaks und Peaks der Masse $M = 91$) aufgezeichnet.



Graphische Darstellung 13:

Abbildung eines kombinierten GC-Massenspektrums.

----- = Gaschromatogramm

_____ = Massenspektrometrische Aufzeichnung der Masse $M = 91$.

D. Diskussion

Bei den Untersuchungen über α -Benzylmalat-Synthase und α -Benzylmalat-Isomerase mußte abweichend von den üblichen photometrischen Enzymtests ein radiochemisches Testverfahren angewendet werden. Schwierigkeiten ergaben sich dabei vor allem bei Inkubationen von Präparationen mit L-Phenylalanin-4- ^3H . Trotz mehrfacher papier- und gaschromatographischer Reinigung wurde immer wieder ein Verschmieren der Radioaktivität beobachtet. Mit Hilfe kombinierter GC-Massenspektren konnten zwar 10 - 15 % der verschmierten Aktivität auf eine Zersetzung der Benzyläpfelsäuren zurückgeführt werden, eine weitergehende Klärung des Phänomens war damit jedoch nicht möglich. Spekulationen über einen Austausch des p- ^3H am Benzolring mit dem Lösungsmittel erschienen deshalb naheliegend. Unterstützt wurde diese Hypothese dadurch, daß jeweils ein großer Anteil der verschmierten Radioaktivität unter dem Lösungsmittelpeak der gaschromatographischen Trennungen zu finden war. Eine Lösung dieses Problems konnte durch den Einsatz von L-Phenylalanin-U- ^{14}C und in der Bestimmung der Benzyläpfelsäuren durch Umkristallisieren zur konstanten spezifischen Aktivität anstelle der gaschromatographischen Trennverfahren gefunden werden. Trotz dieser Schwierigkeiten im Testverfahren waren beide Enzyme mit Sicherheit nachweisbar. Die Zuverlässigkeit des Tests konnte zusätzlich in einem Kontrollversuch belegt werden, wo gezeigt wurde, daß ohne die Bereitstellung von Phenylpyruvat aus Phenylalanin durch LAOD kein Einbau von Radioaktivität in Benzylmalat stattfindet. Damit ist zum einen ein Hinweis auf die Rolle des Phenylpyruvats als "intermediate" bei der Bildung der Benzyläpfelsäuren aus Phenylalanin in vitro gegeben, zum anderen ist damit ein Beweis für die Zuverlässigkeit des Testverfahrens erbracht.

Erhebliche Schwierigkeiten bereiteten neben der Kompliziertheit des radiochemischen Enzymtests die äußerst geringen Umsätze von α -Benzylmalat-Synthase und mit Einschränkung von α -Benzylmalat-Isomerase. So konnten für α -Benzylmalat-Synthase in Rohextrakten maximale Umsätze von 5×10^{-3} % der einge-

setzten Radioaktivität gemessen werden, bei weiterer Fraktionierung der Präparationen waren die Einbauraten noch geringer. Bezieht man die Umsätze des Enzyms auf die eingesetzten Proteinmengen, so kommt man zu spezifischen Aktivitäten von max. 3×10^{-8} U/mg Protein. Die äußerst geringe, spezifische Aktivität und die resultierenden geringen Umsätze erschwerten alle weiteren geplanten Arbeiten und waren wohl auch verantwortlich dafür, daß α -Benzylmalat-Synthase in früheren Versuchen in vitro nicht eindeutig nachgewiesen werden konnte.

Trotz der geringen spezifischen Aktivität des Enzyms gelang es des weiteren, das Molekulargewicht der α -Benzylmalat-Synthase gelchromatographisch zu 45.000 ± 5.000 zu bestimmen.

Auch über die Lokalisierung der Synthase in der Zelle erscheinen aufgrund der Ergebnisse Aussagen möglich. Da Maxima des Benzylmalat-Synthaseaktivität in allen Aufarbeitungen jeweils in der löslichen Proteinfraction und um Faktor 2 geringere Aktivitäten in der Microsomenfraction gefunden wurden, sollte α -Benzylmalat-Synthase ein schwach an die Microsomenmembran assoziiertes oder ein cytoplasmatisches Enzym sein. Eine mehrfach bestätigte Aktivitätsverteilung von 2 : 1 zwischen löslicher Fraction und leichten Membranen machen eine Assoziation an die microsomalen Membranen wahrscheinlich.

Tracy und Kohlhaw ⁸⁾ diskutieren für Hefe eine Lokalisierung von α -Isopropylmalat-Synthase und Homocitrat-Synthase in den Mitochondrien. Für α -Benzylmalat-Synthase konnte dieser Befund nicht bestätigt werden. Bei allen Inkubationsansätzen mit schweren Membranfraktionen (Mitochondrien, Chloroplasten) war die Einbaurate in α -Benzylmalat in dieser Fraction erheblich geringer als in der Überstands- und Microsomenfraction, so daß eine Lokalisierung der Benzyl-

malat-Synthase in den Mitochondrien unwahrscheinlich ist. In Übereinstimmung mit einem Literaturhinweis²⁹⁾ wird eine Assoziierung der Synthaseaktivität mit der Chloroplastenmembran ausgeschlossen.

Als zweites Enzym der Biosynthesesequenz konnte α -Benzylmalat-Isomerase in partikulären Fraktionen, die aus Rohhomogenaten erhalten wurden, nachgewiesen werden. Maximale Umsätze von 0,2 % der eingesetzten Radioaktivität waren so bestimmbar. Trotz der vergleichsweise hohen Umsätze gestaltete sich der Nachweis dieses Enzyms schwierig, da die spezifische Aktivität der eingesetzten α -Benzyläpfelsäure im Vergleich zum markierten Phenylalanin sehr gering war. Die bisherigen Befunde über α -Benzylmalat-Isomerase erlauben daher noch keine Aussage über das Molekulargewicht und die Lokalisierung des Enzyms in der Zelle.

Stellt man die erstmalig in vitro nachgewiesenen Aktivitäten der beiden Enzyme vergleichbaren Werten aus in vivo-Versuchen gegenüber^{16,30)}, so ergeben sich Aktivitätsunterschiede, die im Bereich von Faktor 10 für α -Benzylmalat-Isomerase bis Faktor 1.000 für α -Benzylmalat-Synthase liegen.

Vergleicht man die spezifische Aktivität der α -Benzylmalat-Isomerase mit denen anderer Alkylmalat-Synthasen, ergeben sich ebenfalls krasse Aktivitätsunterschiede.

So konnten Webster und Gross¹⁾ in Rohextrakten aus Neurospora eine spezifische Aktivität von 0,9 U/mg für α -Isopropylmalat-Synthase ermitteln. Für das gleiche Enzym aus Salmonella typhimurium fanden Kohlhaw, Leary und Umbarger in Rohhomogenaten eine spezifische Aktivität von 10,8 U/mg Protein.⁷⁾ Größenordnungsmäßig weitaus vergleichbarer mit der spezifischen Aktivität der α -Benzylmalat-Synthase ist der Wert für Homocitrat-Synthase aus Heferohextrakten, den Tucci und Ceci¹⁰⁾ zu 2×10^{-5} U/mg Protein bestimmten.

Diese Beispiele für den Nachweis von Alkylmalat-Synthasen in vitro wurden sämtlich in Präparationen aus Bakterien und Pilzen durchgeführt.

Der Nachweis einer Alkylmalat-Synthaseaktivität in höheren Pflanzen ließ sich bisher lediglich in einem Fall erbringen.

Oaks ¹¹⁾ gelang es 1965 eine α -Isopropylmalat-Synthase in Homogenaten aus Mais nachzuweisen. Die spezifische Aktivität des Enzyms betrug 10^{-2} U/mg Protein.

Die Synthase ist durch Leucin, das Endprodukt der Synthesekette, hemmbar. Außerdem wurde eine Stabilisierung des Enzyms durch sein Substrat α -Ketoisovalerat beobachtet. Vergleicht man die spezifischen Aktivitäten von α -Isopropylmalat-Synthase aus Mais mit der von α -Benzylmalat-Synthase, so ist auch hier eine starke Differenz festzustellen.

Diese großen Unterschiede in der spezifischen Aktivität könnten einmal durch die Instabilität der α -Benzylmalat-Synthase in vitro bedingt sein, ein stabilisierender Effekt von Phenylpyruvat wurde bisher jedoch nicht untersucht. Zum anderen ist die Zerstörung einer räumlich gesichteten Anordnung auf einer Membran der Microsomenfraktion als Grund für die geringe spezifische Aktivität des Enzyms in vitro denkbar.

Schonendere Aufarbeitung des Blattmaterials, eine methodisch verbesserte Abtrennung der Microsomenfraktion und ein effektiveres Anreicherungsverfahren für die Synthase aus der Überstandsfraktion sollten diese Schwierigkeiten bei weiterer Verbesserung der analytischen Methoden beseitigen können und eine weitergehende Charakterisierung der α -Benzylmalat-Synthase ermöglichen.

Über eine Hemmung durch Coenzym A und eine Mg^{2+} -Abhängigkeit der α -Benzylmalat-Synthase, wie sie Kohlhaw und Mitarbeiter ⁸⁾ für α -Isopropylmalat-Synthase berichteten, kann noch keine Aussage gemacht werden; jedoch könnte sich auch aus Untersuchungen in dieser Richtung eine Verbesserung der Einbaurate ergeben.

In der vorliegenden Arbeit wird ein weiterer Beleg für den in Schema 1 dargestellten allgemeinen Mechanismus der Kettenverlängerung von Aminosäuren um C_1 -Einheiten durch Ankondensation von Acetyl-Coenzym A und spätere

Decarboxylierung in vitro geliefert. "Condensing enzyme"-Systeme wurden bereits in Bakterien ^{3,4,5,6)}, in Pilzen ^{1,2,9,10)} und in höheren Pflanzen bei der Bildung von Leucin aus Valin in vitro nachgewiesen. Die hier dargestellten Ergebnisse über α -Benzylmalat-Synthase und -Isomerase sind ein Beispiel für ein "condensing enzyme"-System in vitro im Rahmen des Stoffwechsels aromatischer Aminosäuren in höheren Pflanzen. Es erscheint deshalb gerechtfertigt, die in Schema 1 dargestellt Biosynthesesequenz bei der Homologisierung von Aminosäuren als weitgehend allgemeingültig anzusehen. Die Verallgemeinerung bedeutet zwar nicht, daß Homologisierungen grundsätzlich nach diesem Schema zu verlaufen haben, jedoch dürfte in einer Vielzahl von weiteren Organismen dieser Biosyntheseweg beschriftet werden, wie in verschiedenen in vivo-Systemen bereits belegt werden konnte. ^{12,14,15,16)}

E Literaturverzeichnis

- 1 R.E. Webster, S.R. Gross (1965) Biochemistry 4, 2309
- 2 R.E. Webster, C.A. Nelson, S.R. Gross (1965)
 Biochemistry 4, 2318
- 3 C. Jungwirth, S.R. Gross, P. Margolin, H.E. Umbarger
 (1963) Biochemistry 2, 1
- 4 S.R. Gross, R.O. Burns, H.E. Umbarger (1963)
 Biochemistry 2, 1046
- 5 S.R. Gross, R.O. Burns, H.E. Umbarger (1963)
 Biochemistry 2, 1053
- 6 P. Margolin (1963) Genetics 48, 441
- 7 G.B. Kohlhaw, T.R. Leary, H.E. Umbarger (1969)
 Bio.Chem. 244, 2218
- 8 J.W. Tracy, G.B. Kohlhaw (1975) Proc.Nat.Acad.Sci. 72, 1802
- 9 G.B. Kohlhaw, E.D. Ryan, E. Leary (1973) J.Bact. 116, 222
- 10 A.F. Tucci, L.M. Ceci (1972) Arch.Biochem.Biophys. 153, 742
- 11 A. Oaks (1965) Biochem.Biophys.Acta 111, 79
- 12 M.D. Chisholm, L.R. Wetter (1964) Can.J.Biochem. 42, 1033
- 13 M. Sugii, Y. Suketa, T. Suzuki (1964)
 Chem.Pharm.Bull 12, 1115
- 14 E.W. Underhill (1965) Can.J.Biochem. 43, 179
- 15 E.W. Underhill (1968) Can.J.Biochem. 46, 401
- 16 D. Dörnemann, W. Löffelhardt, H. Kindl (1974)
 Can.J.Biochem. 52, 916
- 17 E. Libbert (1973) Lehrbuch der Pflanzenphysiologie,
 G. Fischer, Verlag Stuttgart, S. 209
- 18 O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall
 (1951) J.Biol.Chem. 193, 265
- 19 P. Schopfer (1970) Experimente zur Pflanzenphysiologie
 Rombach Paperback S. 106
- 20 A.W.D. Avison (1955) J.Chem.Soc. 1955, 732
- 21 H.U. Bergmeier, K. Gawehn, M. Graßl (1970) Methoden
 der enzymatischen Analyse, Verlag Chemie-Weinheim,
 Band 1, S. 468

- 22 H.U. Bergmeier, K. Gawehn, M. Graßl (1970) Methoden der enzymatischen Analyse, Verlag Chemie-Weinheim, Band 1, S. 478
- 23 H.U. Bergmeier, K. Gawehn, M. Graßl (1970) Methoden der enzymatischen Analyse, Verlag Chemie-Weinheim, Band 1, S. 446
- 24 J. Nelson (1944) J. Biol.Chem. 153, 375
- 25 H.U. Bergmeier, K. Gawehn, M. Graßl (1970) Methoden der enzymatischen Analyse, Verlag Chemie-Weinheim, Band 1, S. 455
- 26 Isolab-Produktinformation (Acron, Ohio) 1974
- 27 Handbook of Chemistry and Physics (Hrsg. R.C. Wert) 53. Ausg. 1972/73, Chem.Rubber Co., Cleveland, Ohio
- 28 W.A. Simon, D.E. Shemin (1953), J. Am.Chem.Soc. 75, 2520
- 29 W. Löffelhardt (1972), Dissertation, Wien
- 30 E.W. Underhill, M.D. Chesholm, L.R. Wetter (1962) Can.J.Biochem.Physiol. 40, 1505
- 31 Z. Horii, T. Sakai, Y. Tamura (1961) Chem.Pharm. Bull (Tokio) 9, 451

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von
Dezember 1973 bis Dezember 1976 im Fachgebiet
Biochemie am Fachbereich Chemie durchgeführt.

Herrn Professor Dr. H. Kindl

danke ich sehr für die interessante Themen-
stellung, seine wertvollen Ratschläge und die
stets großzügige Förderung und Unterstützung.

LEBENS LAUF

Geburtsdatum:	07. September 1946
Geburtsort:	Zwickau (Sachsen)
Eltern:	Handelskaufmann Gustav Dörnemann und Klara Käthe Maertin, gesch. Dörnemann, geb. Fröhlich
Ehefrau:	Christa Dörnemann, geb. Haber
1953 - 1957	Volksschule Wanne-Eickel und Dönberg
1957 - Ostern 1966	Gymnasium Wuppertal, Schwerte und Siegen (Abitur)
1966 - 1968	Wehrdienst Augustdorf, Munster und Hemer
Sommersemester 1968	Immatrikulation an der Philipps- Universität Marburg/Lahn
Mai 1970	Vordiplomprüfung in Chemie
Oktober 1973	Hauptdiplomprüfung in Chemie
seit November 1972	Anfertigung der Diplomarbeit unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. H. Kindl
seit Dezember 1973	Anfertigung der Doktorarbeit unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. H. Kindl
seit März 1974	Tätigkeit als Wissenschaftliche Hilfskraft m.A.

